

# **Albumin-Nanopartikel als Trägersysteme für Antisense-Oligonukleotide zur Anwendung in der Brustkrebstherapie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe - Universität

Frankfurt am Main

von

Heidrun Wartlick

aus Tübingen

Frankfurt am Main, 2004

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

|                        |                         |
|------------------------|-------------------------|
| Dekan:                 | Prof. Dr. H. Schwalbe   |
| 1. Gutachter:          | Prof. Dr. J. Kreuter    |
| 2. Gutachter:          | Prof. Dr. K. Strebhardt |
| Datum der Disputation: | 11.02.2005              |





## VORWORT

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Kreuter** möchte ich für die Auswahl und Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit, unter seiner Anleitung meine Dissertation an seinem Institut anfertigen zu können, herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Klaus Langer** für seine wissenschaftliche Betreuung und stets gewährte Unterstützung zur Durchführung der vorliegenden Arbeit. Seine wertvollen Anregungen, seine Diskussionsbereitschaft und Hilfsbereitschaft in allen wissenschaftlichen und technischen Belangen haben erheblich zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen.

Herrn **Prof. Dr. Strebhardt** vom Molekularbiologischen Labor der Frauenklinik am Universitätsklinikum in Frankfurt danke ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis die entwickelten mit Antisense-Oligonukleotid beladenen partikulären Trägersysteme in Zellkulturexperimenten zu testen. Des Weiteren möchte ich ihm für seine Diskussionsbereitschaft sowie für die Übernahme des Koreferats meinen Dank aussprechen. Seiner Mitarbeiterin Frau **Brigitte Zimmer** gebührt mein besonderer Dank für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Zellkulturversuchen.

Bei allen Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe um Dr. Klaus Langer am Biozentrum und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Strebhardt an der Frauenklinik möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor bedanken. **Sabine Balthasar** und **Kerstin Michaelis** möchte ich insbesondere für die Bereitstellung der Antikörper-modifizierten Nanopartikel herzlich danken.

Heidrun Wartlick

Frankfurt, Oktober 2004



---

 INHALTSVERZEICHNIS

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | THEORETISCHER TEIL .....                                    | 1  |
| 1.1     | Brustkrebs .....  | 1  |
| 1.1.1   | Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor2 (HER2) .....  | 1  |
| 1.1.1.1 | Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie .....        | 2  |
| 1.1.1.2 | Liganden .....  | 2  |
| 1.1.2   | HER2-Antikörpertherapie .....                               | 4  |
| 1.1.2.1 | Trastuzumab (Herceptin®) .....                              | 4  |
| 1.1.2.2 | Zulassung .....   | 4  |
| 1.1.2.3 | Kombinationstherapie von Trastuzumab mit Zytostatika .....  | 4  |
| 1.2     | Nanopartikel in der Tumorthherapie .....                    | 5  |
| 1.2.1   | Nanopartikel .....  | 5  |
| 1.2.2   | Drug-Targeting .....  | 6  |
| 1.2.2.1 | Passives Targeting .....                                    | 6  |
| 1.2.2.2 | Aktives Targeting .....                                     | 7  |
| 1.2.2.3 | Enhanced Permeability and Retention (EPR)-Effekt .....      | 8  |
| 1.2.3   | Aufnahme der Nanopartikel in Zielzellen .....               | 8  |
| 1.2.3.1 | Endozytose .....  | 8  |
| 1.2.3.2 | Phagozytose von partikulären Fremdstoffen .....             | 9  |
| 1.2.3.3 | Mechanismus der Partikelaufnahme .....                      | 10 |
| 1.2.4   | Anwendungsgebiete in der Tumorthherapie .....               | 11 |
| 1.2.4.1 | Passives Targeting .....                                    | 12 |
| 1.2.4.2 | Aktives Targeting .....                                     | 14 |
| 1.2.4.3 | Etablierung von Eisenoxid-NP in der Tumorthherapie .....    | 15 |
| 1.3     | Nanopartikel als Träger für Antisense-Oligonukleotide ..... | 16 |
| 1.3.1   | Antisense-Oligonukleotide (ASO) .....                       | 16 |
| 1.3.1.1 | Chemische Modifikation der ASO .....                        | 18 |
| 1.3.1.2 | Sequenz-unspezifische Wirkung von ASO .....                 | 21 |
| 1.3.1.3 | Klinische Studien .....                                     | 21 |
| 1.3.1.4 | Perspektiven .....  | 23 |
| 1.3.2   | Einsatz von Nanopartikeln in der ASO-Therapie .....         | 24 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1.3.2.1 | Kationische Reagenzien als Hilfsstoffe .....   | 25 |
| 1.3.2.2 | Konjugation des ASO an ein hydrophobes Molekül .....   | 26 |
| 1.3.2.3 | Adsorption des ASO an die Partikeloberfläche .....   | 27 |
| 1.3.2.4 | Inkorporation des ASO in die Partikelmatrix.....   | 28 |
| 1.3.2.5 | Testung in Zellkulturversuchen .....   | 28 |
| 1.3.2.6 | Testung in Tiermodellen.....   | 30 |
| 1.4     | Ziel der Arbeit.....   | 31 |
| 2       | MATERIAL UND METHODEN .....  | 33 |
| 2.1     | Herstellung von ASO-beladenen HSA-Nanopartikeln .....  | 33 |
| 2.1.1   | Chemikalien und Geräte .....   | 33 |
| 2.1.2   | Adsorptionsversuch von ASO an gelöstem HSA .....   | 34 |
| 2.1.3   | Optimierung der Partikelherstellung.....   | 34 |
| 2.1.4   | Standardprotokoll der ASO-Einbindung in HSA-NP.....  | 34 |
| 2.1.5   | Variation des ASO .....  | 35 |
| 2.2     | Einbindung von ASO in kationisierte HSA-Nanopartikel .....                                   | 35 |
| 2.2.1   | Chemikalien und Geräte .....   | 35 |
| 2.2.2   | Kationisierung von HSA.....  | 36 |
| 2.2.3   | Optimierung der Partikelherstellung.....   | 36 |
| 2.3     | Adsorption von ASO an Oberflächen-kationisierte HSA-Nanopartikel .....                       | 37 |
| 2.3.1   | Chemikalien und Geräte .....   | 37 |
| 2.3.2   | Kationisierung der Partikeloberfläche .....  | 37 |
| 2.3.3   | Adsorption von ASO an Oberflächen-kationisierte HSA-NP .....                                 | 38 |
| 2.4     | Charakterisierung der Nanopartikel.....  | 38 |
| 2.4.1   | Chemikalien und Geräte .....   | 38 |
| 2.4.2   | Bestimmung der Proteinkonzentration in den Waschüberständen<br>der Partikel mittels BCA..... | 38 |
| 2.4.3   | Bestimmung der Partikelgröße .....   | 39 |
| 2.4.4   | Bestimmung des Zetapotentials.....   | 39 |
| 2.4.5   | Bestimmung des Nanopartikelgehaltes .....  | 39 |



|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.5     | Bestimmung des ASO-Gehaltes in Partikeln.....   | 40 |
| 2.5.1   | Chemikalien und Geräte .....  | 40 |
| 2.5.2   | HPLC-Methode .....  | 41 |
| 2.5.2.1 | Methode A: Quantifizierung von ODN .....  | 41 |
| 2.5.2.2 | Methode B: Quantifizierung von PTO.....   | 41 |
| 2.5.3   | Indirekte Bestimmung über Waschüberstände der Partikel .....                              | 42 |
| 2.5.4   | Direkte Bestimmung mittels Partikelabbau .....  | 42 |
| 2.5.4.1 | Etablierung einer Methode zum Partikelabbau.....  | 42 |
| 2.6     | Zellkulturen.....   | 43 |
| 2.6.1   | Chemikalien und Geräte .....  | 43 |
| 2.6.2   | Krebszell-Linien .....  | 44 |
| 2.6.2.1 | Charakteristika der Krebszell-Linien.....   | 44 |
| 2.6.2.2 | Kultivierung der Krebszell-Linien.....  | 45 |
| 2.6.3   | Zytotoxizitäts-Test.....  | 45 |
| 2.6.4   | Partikelstabilität in Zellkulturmedium.....   | 46 |
| 2.6.5   | Zellaufnahmestudien der NP mittels CLSM .....   | 46 |
| 2.6.5.1 | Partikelherstellung.....  | 46 |
| 2.6.5.2 | Konfokales Laserscanning Mikroskop<br>(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM).....     | 46 |
| 2.6.5.3 | Inkubation und Fluoreszenzmarkieren der Zellmembran .....                                 | 47 |
| 2.6.6   | Untersuchung der intrazellulären Freisetzung von Cy5-ASO<br>aus HSA-NP mittels CLSM ..... | 48 |
| 2.6.7   | Quantifizierung der Partikelaufnahme mittels FACS-Analyse.....                            | 48 |
| 2.6.7.1 | Partikelherstellung.....  | 48 |
| 2.6.7.2 | Inkubationsbedingungen und FACS-Analyse.....  | 48 |
| 2.7     | Antikörper-vermittelte zelluläre Partikelaufnahme .....                                   | 49 |
| 2.7.1   | Chemikalien und Geräte .....  | 49 |
| 2.7.2   | Biotinylierung von Trastuzumab.....   | 51 |
| 2.7.3   | Herstellung AK-modifizierter Partikelsysteme .....  | 51 |
| 2.7.3.1 | Herstellung von Gelatine-Nanopartikeln.....   | 51 |
| 2.7.3.2 | Indirekte Konjugation des Antiköpers an Albumin-Nanopartikel...                           | 52 |
| 2.7.3.3 | Direkte Konjugation des Antiköpers an Albumin-Nanopartikel ....                           | 53 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.7.4   | HER2-Proteinnachweis mittels Western Blot.....  | 54 |
| 2.7.5   | Quantifizierung der zellulären NP-Bindung mittels FACS.....                                 | 54 |
| 2.7.5.1 | Zellspezifische Bindung von anti-HER2-Nanopartikeln .....                                   | 55 |
| 2.7.5.2 | Zeitabhängigkeit der Partikelbindung .....  | 55 |
| 2.7.5.3 | Einfluss der Partikelkonzentration auf die zelluläre Bindung .....                          | 55 |
| 2.7.6   | Untersuchung der Zellverteilung von anti-HER2-NP mittels CLSM .....                         | 56 |
| 2.7.7   | Intrazelluläre Freisetzung von Cy5-ASO aus anti-HER2-NP .....                               | 56 |
| 2.7.8   | Quantifizierung der Transfektionseffizienz mittels FACS .....                               | 57 |
| 2.8     | Nachweis des Antisense-Effektes .....   | 57 |
| 2.8.1   | Chemikalien und Geräte .....  | 57 |
| 2.8.2   | Eingesetzte Proben für den Nachweis des Antisense-Effektes .....                            | 58 |
| 2.8.3   | Bestimmung der Zellzahl .....   | 58 |
| 2.8.4   | LDH-Test .....  | 58 |
| 2.8.5   | MTT-Test .....  | 59 |
| 3       | ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....  | 61 |
| 3.1     | Herstellung von ASO-beladenen HSA-NP .....  | 61 |
| 3.1.1   | Adsorptionsversuch von ASO an gelöstes HSA .....  | 61 |
| 3.1.2   | Optimierung der Partikelherstellung.....  | 63 |
| 3.1.2.1 | Variation der Ethanolmenge.....   | 63 |
| 3.1.2.2 | Variation der Menge an Quervernetzung .....   | 65 |
| 3.1.2.3 | Variation des ASO: ODN / PTO / Kettenlänge .....  | 66 |
| 3.1.2.4 | Variation der Aufreinigungsschritte .....   | 67 |
| 3.1.2.5 | Standardprotokoll: Beladung von HSA-NP mit ASO .....  | 68 |
| 3.2     | Einbindung von ASO in kationisierte HSA-NP.....   | 69 |
| 3.2.1   | Kationisierung von HSA.....   | 69 |
| 3.2.2   | Variation des pH-Wertes und der Menge an kationisiertem HSA<br>bei der NP-Herstellung ..... | 70 |
| 3.2.3   | Einfluss des Zetapotentials auf die zelluläre Aufnahme.....                                 | 71 |
| 3.3     | Adsorption von ASO an Oberflächen-kationisierte HSA-NP.....                                 | 73 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 3.4     | Bestimmung des ASO-Gehaltes in NP .....                                  | 75  |
| 3.4.1   | Direkte Bestimmung mittels Partikelabbau .....                           | 75  |
| 3.4.1.1 | Partikelherstellung mit unterschiedlicher Quervernetzung .....           | 75  |
| 3.4.1.2 | Enzymatischer Partikelabbau.....   | 76  |
| 3.4.2   | Wiederfindungsrate des ASO .....   | 77  |
| 3.4.3   | Vergleich der Beladungseffizienz und der Beladungskapazität .....        | 78  |
| 3.5     | Zellkultur.....  | 80  |
| 3.5.1   | Partikelstabilität in Zellkulturmedium.....                              | 80  |
| 3.5.1.1 | Albumin-Nanopartikel (HSA-NP) .....                                      | 80  |
| 3.5.1.2 | Oberflächen-kationisierte Albumin-NP (NP+).....                          | 80  |
| 3.5.2   | Zytotoxizitäts-Test.....   | 82  |
| 3.5.2.1 | Albumin-NP (HSA-NP) .....  | 82  |
| 3.5.2.2 | Kationische HSA-NP (cHSA-NP) .....                                       | 85  |
| 3.5.3   | Zellaufnahme von HSA-NP und intrazelluläre Verteilung von ASO .....      | 86  |
| 3.5.3.1 | Zellaufnahmestudien.....   | 86  |
| 3.5.3.2 | Intrazelluläre Freisetzung von Cy5-ASO aus HSA-NP .....                  | 88  |
| 3.5.4   | Sättigung der Partikelaufnahme.....                                      | 91  |
| 3.5.5   | Fazit: Eignung als Trägersystem .....                                    | 92  |
| 3.6     | Antikörper-vermittelte zelluläre Partikelaufnahme .....                  | 95  |
| 3.6.1   | Herstellung AK-modifizierter Partikelsysteme .....                       | 96  |
| 3.6.2   | Zellkulturexperimente .....  | 97  |
| 3.6.2.1 | HER2-Proteinnachweis mittels Western Blot .....                          | 97  |
| 3.6.2.2 | Zellspezifische Bindung von anti-HER2-Nanopartikeln .....                | 98  |
| 3.6.2.3 | Zeitabhängigkeit der Partikelbindung .....                               | 100 |
| 3.6.2.4 | Einfluss der Partikelkonzentration auf die zelluläre Bindung.....        | 101 |
| 3.6.2.5 | Untersuchung der Zellverteilung von AK-Nanopartikel<br>mittels CLSM..... | 103 |
| 3.6.2.6 | Intrazelluläre Freisetzung des Cy5-ASO<br>aus anti-HER2-HSA-NP .....     | 104 |
| 3.6.3   | Immunospezifische Nanopartikel .....                                     | 106 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.7   | Nachweis des Antisense-Effektes .....  | 107 |
| 3.7.1 | Charakterisierung der verwendeten NP .....   | 107 |
| 3.7.2 | Wirkung von mit ASO-beladener HSA-NP .....   | 109 |
| 3.7.3 | Quantifizierung der Transfektionseffizienz von SK-Br-3-Zellen<br>mittels FACS..... | 112 |
| 3.8   | Ausblick: Immunospezifische Nanopartikel<br>als Trägersystem für ASO .....         | 115 |
| 4     | ZUSAMMENFASSUNG .....  | 117 |
| 4.1   | Optimierung der Beladung von NP mit ASO .....                                      | 118 |
| 4.2   | Mit ASO-beladene NP in der Zellkultur.....   | 119 |
| 4.3   | Antikörper-vermittelte Anreicherung von NP in Zielzellen .....                     | 119 |
| 5     | LITERATUR.....   | 123 |
| 6     | LEBENS LAUF .....  | 135 |

---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|              |  |
|--------------|--|
| AK           | Antikörper   |
| ASO          | Antisense-Oligonukleotid                                   |
| Chol         | Cholamin   |
| cHSA         | kationisiertes humanes Serumalbumin                        |
| CLSM         | Confocal laser scanning microscopy                         |
| CTAB         | Cetyltrimethylammoniumbromid                               |
| EDC          | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid               |
| DEAE-Dextran | Diethylaminoethyl-Dextran                                  |
| FACS         | Fluorescence activated cell sorting                        |
| HER2         | Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor2              |
| HSA          | Humanes Serumalbumin                                       |
| IEP          | isoelektrischer Punkt                                      |
| MTT          | 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| MPS          | Mononukleäres phagozytierendes System                      |
| MQ-Wasser    | Milli Q-Wasser   |
| NAv          | NeutrAvidin™   |
| NP           | Nanopartikel   |
| NP+          | Oberflächen-kationisierte Nanopartikel                     |
| ODN          | Oligodesoxynukleotid                                       |
| PACA         | Polyalkylcyanoacrylat                                      |
| PBCA         | Polybutylcyanoacrylat                                      |
| PIBCA        | Polyisobutylcyanoacrylat                                   |
| PIHCA        | Polyisohexylcyanoacrylat                                   |
| PEG          | Polyethylenglykol  |
| PLA          | Polymilchsäure   |
| PLGA         | Polymilch-co-glykolsäure                                   |
| PLK          | Polo-Like Kinase   |
| PMMA         | Polymethylmethacrylat                                      |
| PTO          | Phosphorothioat Oligonukleotid                             |
| PBS          | Phosphate buffered saline                                  |
| PCS          | Photonenkorrelationsspektroskopie                          |
| SDS          | sodium dodecyl sulfate                                     |



# 1 Theoretischer Teil

## 1.1 Brustkrebs

Etwa jede 10. Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom, das damit zu den häufigsten Malignomen der Frau gehört. Als Risikofaktoren werden u.a. Adipositas, Diabetes, fettreiche Ernährung, endokrine Faktoren sowie genetische Prädisposition diskutiert. Durch Operation, Bestrahlung und systemische Therapie kann derzeit zirka die Hälfte der Patientinnen geheilt werden.

Mit Hilfe der verschiedenen diagnostischen Möglichkeiten werden die Voraussetzungen geschaffen, um einen für die jeweilige Patientin maßgeschneiderten Therapieplan zu erstellen. Stützpfeiler der Therapie ist die Operation, die chirurgische Entfernung des Tumors aus der Brust. Oft erfolgt zusätzlich eine Strahlentherapie. Um dem Auftreten von Metastasen vorzubeugen, wird in den meisten Fällen eine medikamentöse Behandlung – eine Hormon- oder Chemotherapie – durchgeführt. Normalerweise wird die Hormontherapie bevorzugt, da es hierbei zur geringsten Toxizität und oft auch zu einer längeren Responsephase kommt.

Hat der Tumor bereits Metastasen gebildet, dient die Behandlung hauptsächlich dazu, Beschwerden vorzubeugen oder sie zu lindern. Metastasierendes Mammakarzinom (Stadium IV) ist eine chronische unheilbare Krankheit. Zur Behandlung von metastasiertem Brustkrebs ist seit Oktober 2000 in Deutschland eine neue Therapie, die HER2-Antikörpertherapie, verfügbar.

### 1.1.1 Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor2 (HER2)

Das HER2-Gen (Synonyme: ErbB2, c-erbB-2) wurde 1985 als menschliches Homolog eines transformierenden Onkogens („neu“) bei der Ratte identifiziert [Venter et al., 1987]. Es kodiert für ein zellmembranständiges Rezeptorprotein mit Tyrosinkinase-Aktivität aus derselben Familie wie der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) [Yarden and Ullrich, 1988; Ullrich and Schlessinger, 1990]. In entarteten Zellen hat man eine Amplifikation des Gens gefunden, die zu einer Überexpression des HER2-Rezeptors führt [King et al., 1985]. Statt ca. 10.000 HER2-Rezeptoren verfügen betroffene Zellen über etwa 1.000.000 dieses Rezeptors. Die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne aktiviert die

intrazelluläre Domäne und löst damit eine Signalkaskade aus, die im Zellkern zu einem Proliferationsreiz führt. Eine Überexpression von HER2 findet man unter anderem in Brust-, Ovarien-, dem endometrialen und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [Slamon et al., 1987].

Wenn eine Überexpression von HER2 im Brustkrebsgewebe nachgewiesen werden kann, ist das Risiko für einen besonders aggressiven Verlauf der Krankheit hoch. Tumorzellen mit diesem Kennzeichen sprechen gegenüber konventionellen Chemo- und Hormontherapien schlecht an [Slamon et al., 1987; Hynes and Stern, 1994; Yu et al., 1994; Klapper et al., 2000].

### **1.1.1.1 Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie**

HER2 gehört zur Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie. Zu dieser Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie gehören nach gegenwärtigem Stand der Forschung vier Rezeptoren (HER1 bis HER4), die jeweils in der Plasmamembran von Zellen lokalisiert sind [Gullick and Srinivasan, 1998]. Am längsten bekannt ist HER1, der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). Rezeptoren der HER2-Familie sind Proteine mit einer extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne. Außen befindet sich die Ligandenbindungstasche. Die zytoplasmatische Domäne wirkt nach Aktivierung als Tyrosin-spezifische Protein-Kinase.

### **1.1.1.2 Liganden**

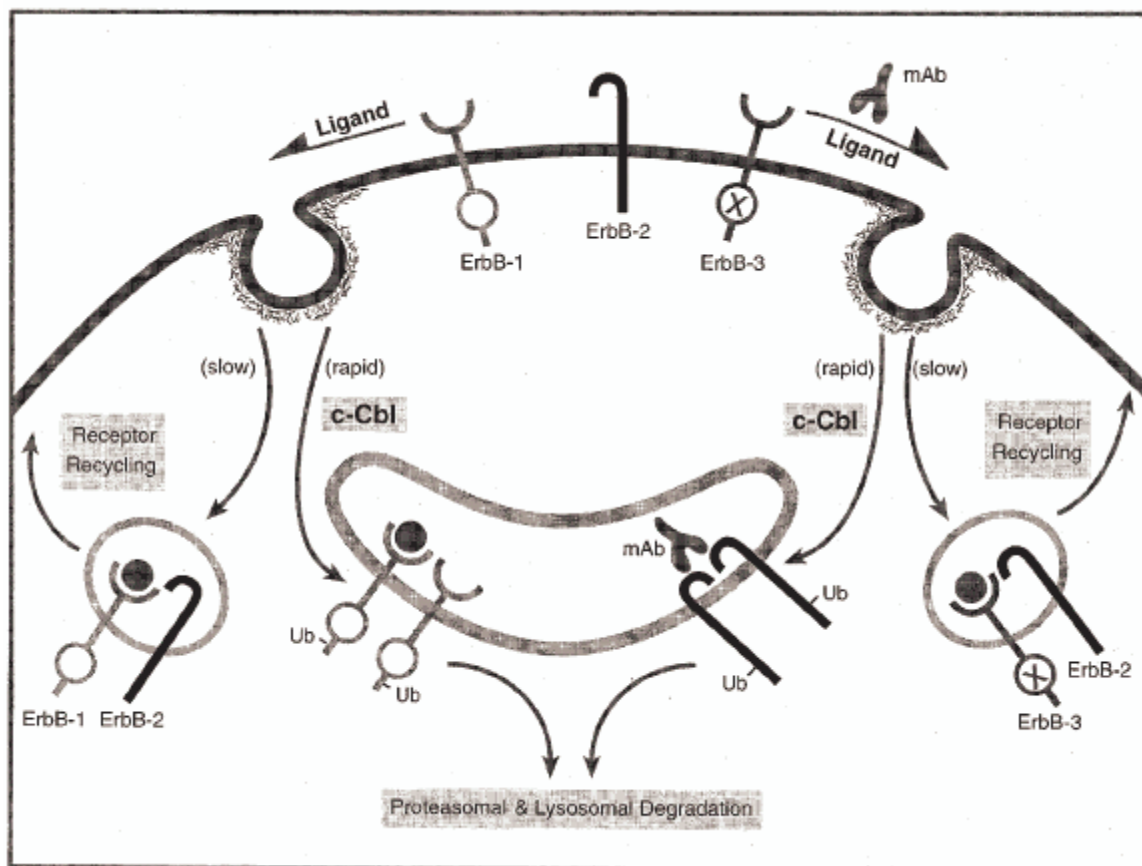
Von den Wachstumsfaktoren, die diese Rezeptoren aktivieren, sind der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der transformierende Wachstumsfaktor alpha (TGF-alpha) die bekanntesten. Daneben gibt es eine Reihe weiterer Wachstumsfaktoren, die ein oder mehrere HER-Rezeptoren aktivieren können. Bislang ist kein Ligand für HER2 identifiziert worden [Harari and Yarden, 2000].

Unter Umständen existiert kein konventioneller spezifischer Wachstumsfaktor für HER2. Das ließe sich aus der Wirkungsweise dieser Rezeptoren durchaus erklären: Denn bindet ein Wachstumsfaktor auf der Zelloberfläche an (s)einen Rezeptor, ist das allein noch kein Signal, das in der Zelle eine Reaktionskaskade mit unterhält. Erst die Verbindung mit einem zweiten Rezeptor (Dimerisierung) führt an der zytoplasmatischen Rezeptor-Domäne zur Eigenphosphorylierung und damit zur Weiterleitung des Signals [Hunter, 2000]. Die Dimerisierung kann zwischen zwei gleichen oder zwei unterschiedlichen HER-Rezeptoren erfolgen. Somit entstehen



Homo- bzw. Heterodimere. HER2 gilt als bevorzugter Dimerisierungspartner für die anderen HER-Rezeptoren [Klapper et al., 1999]. Diese Rolle gewinnt durch eine Überexpression des Rezeptors in Tumorzellen zusätzlich an Gewicht. Zudem sind Heterodimere mit HER2 besonders stabil und können intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse verlängert aktivieren.

Abbildung 1.1: Intrazelluläre Lokalisierung des HER2-Rezeptorkomplexes (ErbB-2-Rezeptorkomplexes) nach Bindung eines Liganden oder Antikörpers; entnommen aus [Harari and Yarden, 2000]



Normalerweise werden Signale, die durch Wachstumsfaktoren ausgelöst werden, rasch durch verschiedene Mechanismen inaktiviert. Dissoziation von Ligand-Rezeptor-Komplex, Dephosphorylierung des aktivierten Rezeptors, schnelle Internalisierung durch „Clathrin-coated Pits“ und die Degradation des aktiven Rezeptors in den Lysosomen sichern eine rasche Beendigung der Signale. Wenn HER2-überexprimiert ist, finden diese Prozesse sehr verlangsamt statt (Abbildung 1.1). Die HER2-Überexpression beschleunigt die Recycling-Geschwindigkeit an die Zelloberfläche und gleichzeitig ist das lysosomale Targeting des Rezeptors vermindert.

## **1.1.2 HER2-Antikörpertherapie**

### **1.1.2.1 Trastuzumab (Herceptin®)**

Die HER2-Antikörpertherapie richtet sich gegen das Oberflächenprotein (HER2), welches bei 25-30% aller Frauen mit Brustkrebs in den Tumorzellen überexprimiert wird [Slamon et al., 1989]. An diesen Brustkrebszellen greift der monoklonale anti-HER2-Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) an, der HER2-Proteine auf der Zelloberfläche blockiert und dadurch deren Dimerisierung mit anderen HER-Rezeptoren verhindert, so dass die Zelle von diesen keine Wachstumssignale mehr erhält. Außerdem kann der Antikörper-Rezeptor-Komplex auf der Zelloberfläche von körpereigenen zytotoxischen T-Killerzellen angegriffen werden, wodurch die Krebszelle zerstört wird [Shak, 1999].

### **1.1.2.2 Zulassung**

Trastuzumab ist zur Behandlung von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom indiziert, deren Tumoren HER2 überexprimieren:

- Als Monotherapie zur Behandlung von Patientinnen, die mindestens zwei Chemotherapieregime gegen ihre metastasierte Erkrankung erhalten haben. Die vorausgegangene Chemotherapie muss mindestens ein Anthracyclin und ein Taxan enthalten haben, oder diese Behandlung ist für die Patientinnen nicht geeignet. Bei Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus muss eine Hormonbehandlung erfolglos gewesen sein, oder diese Behandlung ist für die Patientinnen nicht geeignet.
- In Kombination mit Paclitaxel (Taxol®) zur Behandlung von Patientinnen, die noch keine Chemotherapie gegen ihre metastasierte Erkrankung erhalten haben und für die ein Anthracyclin ungeeignet ist.
- Trastuzumab ist nur bei Patientinnen anzuwenden, deren Tumoren bei immunhistochemischer Bestimmung als HER2 3+ eingestuft werden. (Einteilung der Überexpression von HER2 in Stadien 0 bis 3+)

### **1.1.2.3 Kombinationstherapie von Trastuzumab mit Zytostatika**

Bei Patientinnen mit HER2-überexprimierendem Brustkrebs gehört die Behandlung mit Trastuzumab (Herceptin®) heute zum Standard. Innerhalb relativ kurzer Zeit hat sich die Kombination von Trastuzumab mit Paclitaxel in der First-Line-Therapie bei metastasiertem, HER2-positivem Brustkrebs fest etabliert. Da Trastuzumab ein

spezifisches tumorbiologisches Angriffsziel hat, war der additive antitumorale Effekt in der zugelassenen Kombination mit Paclitaxel eigentlich zu erwarten.

In retrospektiven Studien wurde versucht anhand des HER2-Status eine Aussage über eine mögliche Therapie zu treffen. Eine CMF-Therapie (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil-Therapie) ist für Patientinnen mit HER2-positiven Tumoren erfolgversprechend. Daten bezüglich HER2-Überexpression und einer Tamoxifen-Behandlung deuten auf antagonistische Interaktionen [Ropero et al., 2004].

Darüber hinaus laufen gegenwärtig eine Reihe von Studien, in denen weitere Kombinationen von verschiedenen Zytostatika mit Trastuzumab getestet werden. Erste klinische Daten deuten für Kombinationen von Trastuzumab mit Cisplatin, Docetaxel und Vinorelbin sogar auf synergistische Effekte hin [Pegram et al., 1997]. Man erhofft sich davon weiter erhöhte Ansprechraten. Gegenwärtig werden große multizentrische Studien mit dem Ziel initiiert, den Einsatz von Trastuzumab in die adjuvante Situation vorverlegen zu können [Wang et al., 2001].

## **1.2 Nanopartikel in der Tumorthherapie**

Die Therapiemöglichkeiten bei Tumorerkrankungen sind bis heute bei einem Großteil der Fälle unbefriedigend. Die Erzielung von Therapieerfolgen ist mit hohen Nebenwirkungen und großen Belastungen für die Patienten verbunden. Trotzdem bleibt die Mortalität bei verschiedenen Tumoren hoch.

Paul Ehrlich formulierte als Erster die Idee der „Zauberkegel“, die Wirkstoffe gezielt an ihre Wirkorte bringt und sie dort gesteuert freisetzt. Dies würde zu einer optimalen Wirkung führen, die im Idealfall ohne das Auftreten von Nebenwirkungen erzielt werden könnte. Dieser Ansatz wird mit der Verwendung von Arzneistoff-trägersystemen verfolgt. Von einem Einsatz dieser Trägersysteme erhofft man sich unter anderem einen Durchbruch in der Behandlung von Tumoren.

### **1.2.1 Nanopartikel**

Nanopartikel sind ultrafeine, feste Partikel im kolloidalen Größenbereich zwischen 10 nm bis 1000 nm [Kreuter, 1978], bestehend aus makromolekularen Materialien, wie natürlichen Polymeren (Albuminen, Polysaccharide, Gelatine, etc.) oder synthetischen, gewebeverträglichen Polymeren vom Typ Polyalkylcyanoacrylat, Polyvinylpyrrolidon, Polymilchsäure und Polymilch-co-glycolsäure u.a.m.. Der Arzneistoff befindet sich in der festen Matrix oder Hülle im gelösten oder

hochdispersen Zustand eingeschlossen, an den Randzonen adsorbiert oder adhärirt. Nach Verabreichung von Nanopartikeln findet aus diesen Trägern eine kontrollierte Freisetzung statt.

### **1.2.2 Drug-Targeting**

Unter Drug-Targeting versteht man die gezielte Anreicherung des Arzneistoffs am Wirkort. Ziel des Drug-Targetings ist es, den Arzneistoff wenn möglich nur am Wirkort anzureichern und freizusetzen, sodass andere Gewebe oder Zellorganellen nicht beeinflusst werden [Moghimi et al., 2001].

Nanopartikel besitzen die Fähigkeit, Zielgewebe zu erreichen und die intrazelluläre Aufnahme von Arzneistoffen zu vermitteln. Sie werden hauptsächlich von Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS) aufgenommen [Lenaerts et al., 1984; Bazile et al., 1992]. Zum MPS zählen hauptsächlich Kupffersche Sternzellen der Leber, Makrophagen der Lunge, der Milz, des Knochenmark und der Lymphknoten. Zielgerichtete Anreicherung von Nanopartikeln in Zellen kann durch aktives oder passives Targeting erreicht werden.

#### **1.2.2.1 Passives Targeting**

Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Clearance und die Gewebeverteilung von intravenös applizierten Nanopartikeln stark von ihrer Größe und Oberflächeneigenschaften beeinflusst wird [Patel, 1992; Moghimi and Davis, 1994]. Mit dem passivem Targeting wird versucht, eine Anreicherung der NP im MPS zu umgehen, indem die NP-Größe und die Oberflächeneigenschaften der NP optimiert werden. Diese physikochemischen Eigenschaften können die Partikelopsonierung in biologischen Medien kontrollieren (siehe 1.2.3.2). Die Partikelgröße sollte im Blut klein sein, sodass sie nicht durch einfache Filtration durch das Kapillarbett (Lunge) zurückgehalten werden.

Eine Möglichkeit, das MPS zu umgehen, besteht darin, die NP mit Polyethylenglycol-Derivaten (PEG-Derivate) zu verknüpfen oder die NP mit Detergentien zu überziehen. Daraus resultiert eine niedrigere Aufnahme in das MPS, was eine längere Verweildauer im Blut zur Folge hat, verbunden mit einer verstärkten Anreicherung in Körperkompartimenten außerhalb des MPS. Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln mit PEG-Ketten kann durch die Adsorption von PEG oder durch kovalente Bindung hergestellt werden (PLA: [Bazile et al., 1995], PLGA: [Gref et al., 1994; Suh et al., 1998], Albumin: [Lin et al., 1994; Lin et al., 1999],

Gelatine: [Kaul and Amiji, 2002], PIBCA: [Peracchia et al., 1997; Peracchia et al., 1999], PS: [Dunn et al., 1994]). Erfolge einer Umgehung des MPS können ebenso mit geeigneten Detergentien erzielt werden. In einer ausführlichen Studie von Tröster et al. wurden zahlreiche Detergentien getestet [Tröster et al., 1990; Tröster and Kreuter, 1992; Kreuter et al., 2003]. Alle Detergentien ergaben eine Umverteilung der NP in andere Organe außerhalb des MPS. Polysorbat 80 und Poloxamer 184 führten zur erheblichen Verbesserung der Blutzirkulationszeit, einer Abnahme der Leberanreicherung, höchsten Konzentrationen in anderen Geweben und stellen die Favoriten unter den Detergentien dar. Weitere in der Literatur beschriebene eingesetzte Detergentien sind: Poloxamin 908 [Moghimi et al., 1993; Lode et al., 2001] und Pluronic F68 [Chawla and Amiji, 2003]. Eine rasche Elimination der NP aus dem Blutkreislauf vom MPS kann auch durch eine kleine Partikelgröße vermieden werden [Gaur et al., 2000].

### 1.2.2.2 Aktives Targeting

Um das Problem des unspezifischen Targetings zu umgehen, kann die Spezifität durch Kopplung mit einem monoklonalen Antikörper oder anderen Liganden erhöht werden. Die Nachteile bestehen in ihrer Immunogenität und in der möglichen Dimension des Antikörpers (AK) oder des Liganden, was eine schlechte Diffusion der Partikel durch biologische Barrieren zur Folge haben kann.

Unter möglichen niedermolekularen Substanzen für kleine nicht-antigene Liganden ist **Folsäure** (MW = 441 Da) bekannt [Stella et al., 2000; Oyewumi et al., 2004]. Folsäure hat eine hohe Affinität für einen Oberflächenrezeptor, der häufig auf menschlichen Krebszellen überexprimiert ist. Dieser Folat-Rezeptor wird nach Bindung des Liganden effizient von den Zellen internalisiert. Infolge einer weit verbreiteten Überexpression des Transferrin-Rezeptors in Tumoren stellt das **Transferrin** einen ebenso gut untersuchten Liganden dar [Truong-Le et al., 1999]. Für einen verbesserten Arzneistofftransport im Gastrointestinaltrakt (GIT), an der Augenoberfläche und im Mundbereich haben sich **Lektine** als geeignet erwiesen [Irache et al., 1994; Hussain et al., 1997; McClean et al., 1998; Carreno-Gomez et al., 1999; Ezpeleta et al., 1999; Russell-Jones et al., 1999]. Zahlreiche Studien verwendeten für ein Hepatozyten-spezifisches Targeting Zucker-tragende (**Galaktose**) NP, die den Asialoglykoprotein-Rezeptor spezifisch erkennen [Hirabayashi et al., 1996; Cho et al., 2001a; Cho et al., 2001b].

Signifikante Fortschritte wurden auch bei einer **Antikörper**-vermittelten Therapie erreicht. Zahlreiche monoklonale Antikörper oder Antikörperfragmente gegen Tumorantigen wurden entwickelt, die mit Nanopartikeln konjugiert wurden [Illum et al., 1983; Rolland et al., 1987; Akasaka et al., 1988; Velge-Roussel et al., 1996; Breton et al., 1998; Olivier et al., 2002]. Ebenso könnte ein aktives Targeting in der Brustkrebstherapie durch die Konjugation des anti-HER2-Antikörpers Trastuzumab an NP erreicht werden.

Das Ausmaß der Aufnahme der NP wurde am meisten beeinflusst von der Dichte der Oberflächenmodifikation auf den Nanopartikeln [Russell-Jones et al., 1999]. Die Aufnahme Oberflächen-modifizierter NP konnte in der Gegenwart von spezifischen Inhibitoren verhindert werden, was auf eine hohe Spezifität der Trägersysteme zu bestimmten Zellen schließen lässt.

### 1.2.2.3 Enhanced Permeability and Retention (EPR)-Effekt

Arzneistoffträgersysteme reichern sich in Tumorzellen durch den EPR (Enhanced Permeability and Retention)-Effekt an [Maeda et al., 2000; Maeda, 2001]. Die Anreicherung erfolgt aufgrund der hohen vaskulären Dichte in Tumoren, verbunden mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Tumorgefäße, sowie einer, durch Zytokine verursachten erhöhten Permeabilität. Aufgrund einer verringerten oder fehlenden lymphatischen Drainage des Tumor-Interstitiums ist zusätzlich der Abtransport von Substanzen aus dem Tumor behindert.

### 1.2.3 Aufnahme der Nanopartikel in Zielzellen

Eine weitere Besonderheit von Nanopartikeln besteht darin, dass sie die Fähigkeit besitzen, zelluläre Barrieren zu überwinden. So können NP dazu eingesetzt werden Peptide oder Proteine durch das Epithel des Gastrointestinaltraktes zu transportieren. Ebenso können mit Hilfe von NP Antitumormittel, aber auch andere Arzneistoffe, zum Wirkort ins Zentralnervensystem über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden [Lockman et al., 2002; Kreuter et al., 2003].

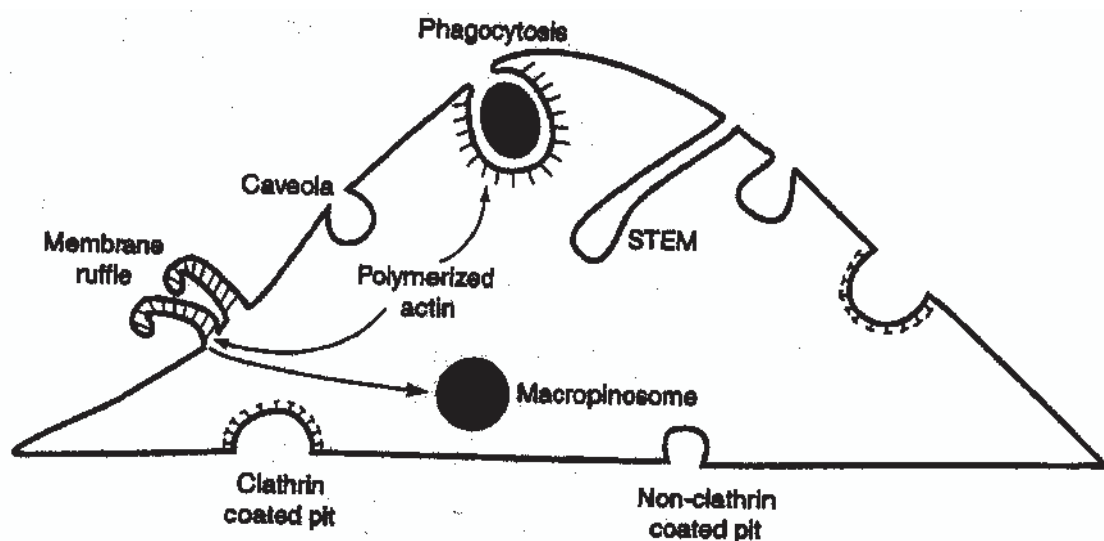
#### 1.2.3.1 Endozytose

Zellen besitzen zahlreiche Möglichkeiten, kleine Moleküle, Makromoleküle, und Partikel zu internalisieren. Alle Prozesse werden unter dem Begriff Endozytose zusammengefasst (Abbildung 1.2). Unter dieser Definition versteht man verschiedene Methoden der Zellaufnahme von extrazellulärem Material durch Zellen.



Die heute am besten verstandene Form ist die Clathrin-abhängige Endozytose, welche durch ihren ersten Schritt, die Internalisierung von extrazellulärem Material an den „Clathrin-coated Pits“ der Plasmamembran, charakterisiert ist. Bei der Caveolae-abhängigen Endozytose spielt das Protein Caveolin eine bedeutende Rolle, und bei der Clathrin-unabhängigen Endozytose wird das Material weder über „Clathrin-coated Pits“ noch über Caveolae aufgenommen [Mukherjee et al., 1997]. Einige Zellen sind in der Lage, große Mengen an extrazellulärem Fluid via Makropinozytose oder große Partikel über Phagozytose aufzunehmen.

Abbildung 1.2: Möglichkeiten der Zellaufnahme von extrazellulärem Material; entnommen aus [Mukherjee et al., 1997]



### 1.2.3.2 Phagozytose von partikulären Fremdstoffen

Phagozytose beinhaltet eine Rezeptor- und Aktin-abhängige und Clathrin-unabhängige Internalisierung von Partikeln und Mikroorganismen im Größenbereich von  $>500$  nm. Partikel, die von Zellen endozytiert werden, werden direkt von Zellen durch einen Rezeptor auf der Zelloberfläche erkannt, oder die Partikel werden zuerst durch den Überzug von Opsoninen gekennzeichnet. Die Hauptkomponenten der Opsoninen sind Komplementfaktoren und Immunglobuline [Furumoto et al., 2002]. Spezifische Rezeptoren erkennen Opsonine und verschlingen die Partikel. Bei phagozytierenden Zellen handelt es sich meistens um Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und die Mikroglia im Gehirn, jedoch besitzen auch andere Zelltypen die Fähigkeit der Phagozytose.

Nach der Partikel Aufnahme in Zellen ist das Trägersystem lokalisiert in einer sauren Umgebung der Endosomen oder Lysosomen und die Partikel werden durch lysosomale Enzyme abgebaut. Wenn der assoziierte Arzneistoff nicht aus den

lysosomalen Kompartiment der Zelle entkommt, wird er ebenso degradiert und gelangt nicht zu seinem Zielort in der Zelle. Eine Möglichkeit den Lysosomen zu entkommen, stellt der Einsatz von Polyethylenimin (PEI), die einen hohen Aminogruppenanteil enthalten, dar. Sie führen durch ihre starke Pufferkapazität zur Aufnahme von Protonen („proton sponge“ Effekt) und dadurch zu einer Schwellung und Ruptur der Lysosomen, was eine Freigabe des Arzneistoffes (meist DNA) zur Folge hat.

### 1.2.3.3 Mechanismus der Partikelaufnahme

Der Mechanismus der partikulären Zellaufnahme ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Um die Aufnahme der Partikel in die Zelle zu beschleunigen, den intrazellulären Verlauf zu manipulieren, und dadurch den Abbau des Arzneistoffes umgehen zu können, ist eine Klärung des Mechanismus jedoch dringend notwendig.

In der Arbeitsgruppe von Labhasetwar wurde die zelluläre Aufnahme von PLGA-NP untersucht [Panyam et al., 2002]. Die Charakterisierung der Aufnahme erfolgte durch den Einsatz einer Kombination aus verschiedenen Endozytose-Inhibitoren, welche mehr oder weniger selektiv einzelne Aufnahmewege hemmen.

Die NP-Aufnahme ist ein Energie-abhängiger Prozess, wie die reduzierte Aufnahme bei niedrigeren Temperaturen (4°C) und einem Energi eentzug nach Behandlung mit Natriumazid und 6-Deoxyglucose zeigen konnte [Panyam et al., 2002; Panyam and Labhasetwar, 2003; Qaddoumi et al., 2003]. Inhibition der „Clathrin-coated Pit“-Endozytose durch hypertonisches Wachstumsmedium verringert die intrazelluläre Aufnahme der NP um 40%, während die Inhibition der „Caveolae-coated Pit“-Endozytose durch Filipin keinen Einfluss auf die NP-Aufnahme zeigte. Die NP-Aufnahme wurde durch die Zugabe von Zytochalasin D (potenter Inhibitor der Aktinpolymerisation) nicht beeinträchtigt. Mikrofilamente spielen daher wohl keine Rolle bei der Aufnahme von NP. Die Inhibition der Mikrotubuli durch Nocodazol ergab eine 66%ige Zunahme der NP-Aufnahme. NP reichern sich nicht in den Transferrin-markierten Kompartimenten an, was darauf hinweist, dass die Mehrheit der NP sich entweder in den späten Endolysosomen oder im Zytoplasma befindet.

Nach der Aufnahme der NP in die frühen Endosomen können die NP entweder in die Recycling- (Exozytose: Ausschleusen aus der Zelle) oder in die späten Endosomen (Transport zu den sekundären Endosomen) gelangen [Panyam and Labhasetwar, 2003]. Ähnliche Wege sind für die Rezeptoren an der Zelloberfläche beschrieben worden. In einer Arbeit von Panyam et al. (2002) wird von einem raschen Austritt der



PLGA-NP aus dem Endolysosom innerhalb von 10 min berichtet [Davda and Labhasetwar, 2002; Panyam et al., 2002; Prabha et al., 2002; Sahoo et al., 2002; Panyam and Labhasetwar, 2003]. Der Mechanismus dieses raschen Austrittes wird durch einen selektiven Wandel der Partikeloberflächenladung von einer anionischen zu einer kationischen Ladung im endolysosomalen Kompartiment erklärt. Betrachtet man das Zetapotential bei verschiedenen pH-Werten, besitzen die PLGA-NP bei pH 4 ein positives Zetapotential, während im physiologisch oder leicht alkalischen Bereich die NP eine negative Ladung aufweisen. Die Folge des Ladungswechsels der NP ist, dass die NP mit der endolysosomalen Membran interagieren und ein Entkommen in das Zytosol stattfindet. Diese These wird unterstützt von der Tatsache, dass die durch Brefeldin A induzierte Tubulation der sekundären Endosomen oder Lysosomen zum Verlust der NP assoziierten grünen Fluoreszenz führt. In Gegenwart von Ammoniumchlorid (lysosomotropisches Agens) kommt es zu einem vollständigen Austritt der NP aus den Endolysosomen. Eine Zunahme des pH-Wertes in den Endolysosomen zeigt eine Zunahme der NP im Zytoplasma. Lysosomotrope Agenzien sind bekannt, eine Destabilisierung der Endolysosomen aufgrund der pH-Änderung zu verursachen. Durch die Freisetzung ihres Inhaltes haben lysosomotrope Agenzien toxische Effekte. Bei der Inkubation mit NP treten keine toxischen Effekte in der Zellkultur nach 48h auf. Die NP werden wahrscheinlich durch eine lokale Destabilisierung der Endosomenmembran und einer Extrusion der NP durch die Endosomenmembran freigesetzt. Ein Vergleich mit PS-NP bestätigt diese Tatsache. Eine Untersuchung der Zellverteilung mit PS-NP, die keine Oberflächenfunktionalitäten und bei allen pH-Werten ein negatives Zetapotential besitzen, zeigte, dass diese PS-NP kolokalisiert im endozytoplasmatischen Kompartiment sind.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die NP-Aufnahme ein Energie-abhängiger Prozess ist. Hauptsächlich erfolgt die NP-Aufnahme über die „Clathrin-coated Pit“-Endozytose. Die Lokalisation der NP in der Zelle hängt nicht nur vom eingeschlagenen Endozytoseweg, sondern auch von den Oberflächeneigenschaften der NP ab.

#### **1.2.4 Anwendungsgebiete in der Tumorthherapie**

Mit Antitumormittel beladene NP steigern erfolgreich die Arzneistoffkonzentration im Tumorgewebe und verbessern dadurch die Wirksamkeit des Arzneistoffes [Brannon-Peppas and Blanchette, 2004]. Darüber hinaus können NP auf zellulärer Ebene

phagozytiert und somit der enthaltene Arzneistoff internalisiert werden. Bestimmte NP ermöglichen dadurch die Überwindung von Chemoresistenzen. Die Assoziation von Antitumormitteln an Trägersysteme führt zu einer gewünschten Veränderung der Arzneistoffverteilung im Körper (im Gegensatz zu Arzneistoff in freier Form) und dadurch zu einer Anreicherung des Arzneistoffes im MPS (Behandlung von Tumoren des MPS) oder bei an der Oberfläche modifizierten Nanopartikeln zu einer Akkumulation außerhalb des MPS.

#### 1.2.4.1 Passives Targeting

Herkömmliche NP (ohne Oberflächenmodifikation: Tabelle 1.1) reichern sich bevorzugt im MPS an und können zur Therapie von Tumoren in Leber, Lunge und Niere eingesetzt werden [Brasseur et al., 1980; Verdun et al., 1990]. In Mäusen mit Lebermetastasen konnte eine verbesserte Wirksamkeit von mit Doxorubicin beladenen Polyisohexylcyanoacrylat-Nanopartikeln gegenüber freiem Arzneistoff gezeigt werden [Chiannilkulchai et al., 1989; Chiannilkulchai et al., 1990]. Dabei konnten die Nebenwirkungen des freien Arzneistoffes, wie die Kardiotoxizität bei Doxorubicin, reduziert werden.

Tabelle 1.1: Einsatz von unmodifizierten Nanopartikeln in der Tumorthherapie

| Nanopartikel             | Arzneistoff   | Literatur   |
|--------------------------|---------------|---|
| PMMA                     | Doxorubicin   | [Astier et al., 1988]   |
| Polyisohexylcyanoacrylat | Doxorubicin   | [Brasseur et al., 1980; Chiannilkulchai et al., 1989; Chiannilkulchai et al., 1990] |
| Polymethylcyanoacrylat   | Actinomycin D | [Verdun et al., 1990]   |
| Polyvinylpyrrolidin      | Taxol         | [Sharma et al., 1996]   |
| Polyalkylcyanoacrylat    | Doxorubicin   | [Soma et al., 2000]   |
| PLGA                     | Doxorubicin   | [Yoo et al., 2000]  |
| Chitosan                 | Doxorubicin   | [Mitra et al., 2001]  |
| Albumin                  | Taxol         | [Damascelli et al., 2001]   |

Die Partikeleigenschaften, wie Partikelgröße, Oberflächenladung und Hydrophilie/Lipophilie des Trägersystems, haben maßgebenden Einfluss auf einen erfolgreichen Einsatz in der Chemotherapie (Tabelle 1.2). Chemotherapie mit Nanopartikeln im Größenbereich von 50 bis 100 nm [Sharma et al., 1996; Mitra et al., 2001] wurden in Tumor-implantierten Mäusen angewandt. Aufgrund der geringen

Partikelgröße und der Hydrophilie des Trägersystemes (Chitosan bzw. Polyvinylpyrrolidin) ergeben sich eine verbesserte Aufnahme in das Tumorgewebe und eine verlängerte Freisetzung des Arzneistoffes als Vorteile in einer effizienteren Chemotherapie.

Mit Doxorubicin beladene PACA-NP führten zu einer Überwindung der Therapieresistenz *in vitro* [de Verdiere et al., 1997]. Die Ergebnisse ergaben, dass die PACA-Abbauprodukte zu einer Erhöhung der Konzentration von Doxorubicin in der Zelle führen und dessen Zytotoxizität erhöhen. Das legt die Vermutung nahe, dass Doxorubicin mit den PACA-Abbauprodukten Ionenpaare bildet und so in die Zelle transportiert wird. Die Resistenz wird überwunden, indem einerseits eine Adsorption der NP an die Zelloberflächen und andererseits, aufgrund der Ausbildung eines Ionenpaares, eine erhöhte Doxorubicin-Diffusion durch die Plasmamembran stattfindet.

Mit Paclitaxel beladene Albumin-NP, die sich schon in der Klinischen Phase II befinden, waren dem freien Arzneistoff hinsichtlich der Toxizität und der Verweildauer im Blut weit überlegen. Aufgrund der vielversprechenden Daten und ihrer guten Verträglichkeit wurde eine Klinische Phase II durchgeführt, in der Albumin-NP an Patienten mit schuppenartigen Zellkarzinom auf Wirksamkeit hin untersucht wurden [Damascelli et al., 2001].

Tabelle 1.2: Einsatz von Nanopartikeln mit Oberflächenmodifikation durch Detergentien oder hydrophile Polymere in der Tumorthherapie

| Nanopartikel                   | Arzneistoff                                | Modifikation         | Literatur   |
|--------------------------------|--|----------------------|---|
| Polyisobutylcyanoacrylat       | Mitoxantrone                               | Poloxamine 1508      | [Beck et al., 1993; Reszka et al., 1997]                        |
| PLA                            | <i>meta</i> -Tetra-(hydroxyphenyl)-chlorin | PEG<br>Poloxamer 188 | [Bourdon et al., 2000]  |
| PLGA                           | Cisplatin                                  | PEG                  | [Avgoustakis et al., 2002]                                      |
| Poly( $\epsilon$ -caprolakton) | Tamoxifen                                  | Pluronic F68         | [Chawla and Amiji, 2003]  |
| PLA                            | Irinotecan                                 | PEG-Derivat          | [Onishi and Machida, 2003]                                      |
| Polybutylcyanoacrylat          | Doxorubicin                                | Polysorbat 80        | [Kreuter, 2001; Gelperina et al., 2002; Steiniger et al., 2004] |

Werden herkömmliche NP mit Detergentien oder hydrophilen Polymeren überzogen, sollte es zu einer weiteren Verbesserung der Trägereigenschaften kommen. Nach

intravenöser Injektion von mit Mitoxantrone beladenen PIBCA-NP überzogen mit Poloxamine 1508 in einem Mäusetumormodell wurden hohe Konzentrationen an Arzneistoff in Tumorgewebe gemessen, aber eine Überlegenheit gegenüber unmodifizierten NP konnte nicht belegt werden [Beck et al., 1993; Reszka et al., 1997]. Dagegen zeigen jüngste Entwicklungen mit PBCA-NP, wie solche raffiniert gestalteten NP über Oberflächenmodifikation (in diesem Fall mit Polysorbat 80) die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und zu einer erstaunlichen Anreicherung und Doxorubicin-Freisetzung in Glioblastomen der Ratte führen [Kreuter, 2001; Gelperina et al., 2002; Steiniger et al., 2004]. Die erfolgreiche intravenöse Administration von Nanopartikeln, bestehend aus PLGA- bzw. PLA-PEG, in Mäusen verspricht interessante Ergebnisse einer verbesserten zielgerichteten Cisplatin- bzw. Irinotecan-Therapie [Avgoustakis et al., 2002; Onishi and Machida, 2003]. Ergebnisse mit Poly( $\epsilon$ -caprolakton)-NP zeigten, dass diese schnell von Zellen internalisiert werden und dadurch Tamoxifen an seinen Wirkort im Zytoplasma gelangt [Chawla and Amiji, 2003].

Mit Antitumormittel beladene NP verbessern den therapeutischen Nutzen des eingesetzten Antitumormittels durch den Transport über einen längeren Zeitraum zum Zielort.

### **1.2.4.2 Aktives Targeting**

Die Hauptindikation für langzirkulierende NP ist, auch aufgrund des obengenannten EPR-Effektes (siehe 1.2.2.3), zweifelsohne der Einsatz in der Tumorthherapie. Eine Verlängerung der Blutzirkulationszeit alleine ist jedoch nicht ausschlaggebend für eine verbesserte Wirkung, eine Interaktion des Trägersystems mit den Zielzellen ist ebenso wichtig. Eine Möglichkeit besteht, kleine nicht-antigene Liganden oder Antikörper auf die Partikeloberfläche aufzubringen, was eine beschleunigte Internalisierung der NP mit sich bringt und ideal ist für eine Anreicherung eines Antitumormittels in der Zelle (Tabelle 1.3). Es gibt bisher keine Oberflächenmerkmale, die nur bei Tumorzellen vorkommen, jedoch ist meist ein spezielles Antigen auf Tumorzellen weit aus stärker exprimiert als auf Normalzellen.

Tabelle 1.3: Einsatz von Nanopartikel mit Oberflächenmodifikation durch Liganden und Antikörper

| Nanopartikel | Arzneistoff                 | Modifikation                      | Literatur                |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Gadolinium   | Gadolinium                  | PEG<br>Folsäure                   | [Oyewumi et al., 2004]   |
| Gelatine     | DNA                         | Transferrin                       | [Truong-Le et al., 1999] |
| Eisenoxid    | DNA                         |                                   | [Högemann et al., 2000]  |
| Cyclodextrin | DNA                         |                                   | [Bellocq et al., 2003]   |
| Kurdlan      | Vitamin A-Säure             | Galaktose                         | [Na et al., 2000]        |
| PLA          | Paclitaxel                  |                                   | [Cho et al., 2001b]      |
| Lipid        | DNA                         | Integrin-Antagonist               | [Hood et al., 2002]      |
| Lipid        | <sup>90</sup> Y-Radionuklid | Integrin-Antagonist<br>Anti-VEGFR | [Li et al., 2004]        |
| PS           | DNA                         | Anti-PECAM                        | [Wiewrodt et al., 2002]  |

Beispielsweise sind Hepatozyten bekannt dafür, dass sie Glykoproteine mit **Galaktose**-tragenden Seitenketten mit Hilfe ihres Asialoglykoprotein-Rezeptors erkennen. Aufgrund der Ligand-Rezeptor vermittelten spezifischen Interaktion und der kontrollierten Freisetzung des antitumoralen Arzneistoffes in Zellkultur-experimenten, ist dieser Rezeptor eine sinnvolle Zielstruktur bei der Behandlung von Leberkrebs [Na et al., 2000]. Mit Paclitaxel beladene NP wurden mit einem Kohlenhydrat-tragenden Polymer, zielgerichtet auf Hepatozyten, überzogen [Cho et al., 2001b]. Es konnte gezeigt werden, dass das zuckertragende Polymer von den Hepatozyten über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus internalisiert wurde. Eine Akkumulation im Tumorgewebe gelang Oyewumi et al. (2004) mit **Folsäure** überzogenen Nanopartikeln [Oyewumi et al., 2004]. Zahlreiche Arbeiten behandeln den spezifischen Transport mittels **Transferrin** zur Anwendung in der Gentherapie [Truong-Le et al., 1999; Högemann et al., 2000; Bellocq et al., 2003].

#### 1.2.4.3 Etablierung von Eisenoxid-NP in der Tumorthherapie

Eine weitere Strategie, um die Aufnahme der NP in das MPS zu vermeiden, ist die Verwendung von Eisenoxid-Nanopartikeln. Der unter dem Namen „Magnetflüssigkeitshyperthermie“ publizierte Ansatz [Jordan et al., 1999a] benutzt ein von außen angelegtes magnetisches Wechselfeld, um regional deponierte oder in bestimmten Körperregionen angereicherte Eisenoxid-NP in Schwingung zu versetzen und dadurch das Gewebe zu erwärmen. Die Weiterentwicklung dieser NP mit neuen

Hüllstrukturen ermöglicht eine differenzielle Endozytose, das heißt eine bis zu 8-fach höhere und erheblich schnellere Teilchenaufnahme in malignen Zellen im Vergleich zu Normalzellen desselben Gewebetyps. Erste Ergebnisse mit einem intrazerebral transplantierten Ratten-Glioblastom scheinen dieses Endozytoseverhalten auch *in vivo* zu bestätigen [Jordan et al., 1999b].

Darüber hinaus können Eisenoxid-NP anstelle eines Dextranüberzugs mit einer Transferrin-Modifikation versehen werden. In einer Studie von Högemann et al. [2000] wurden Eisenoxid-NP mit Transferrin verknüpft, um eine verbesserte Anreicherung in der Zelle infolge einer spezifischen Rezeptorbindung zu erreichen. Eine mehr als 10-fache höhere Bindung an und die Aufnahme in Zellen führte zu einer 16-fach besseren Genexpression in einem zellulärem Magnetic Resonance Imaging (MRI) Assay.

Von AK auf Eisenoxid-NP wird erwartet, dass sie eine höhere Spezifität der NP im Gewebe vermitteln. Die Partikel sollten eine Größe von 50 nm haben und die Zirkulationszeit sollte lang genug sein, um einige Passagen durch das Tumorgewebe, die Penetration durch die Kapillarwände und Interaktionen von NP mit dem gekoppelten AK und dem Antigen zu ermöglichen [Tiefenauer et al., 1996].

## **1.3 Nanopartikel als Träger für Antisense-Oligonukleotide**

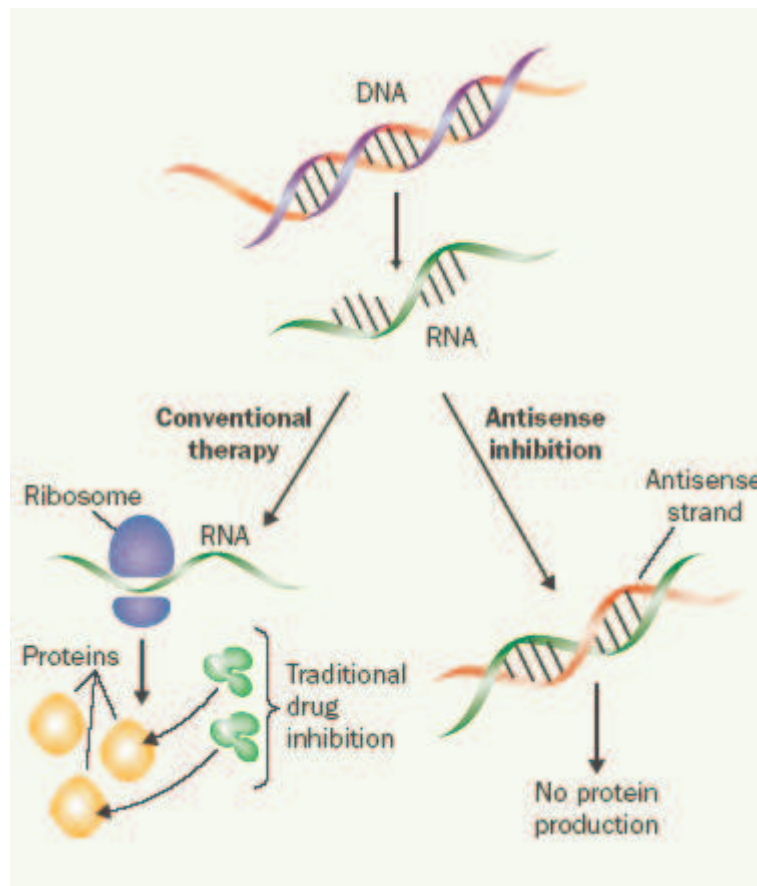
Molekularbiologische Techniken ermöglichen die Charakterisierung molekularer Mechanismen als Ursache von Krankheiten. Die Kenntnis molekularer Grundlagen von Erkrankungen ermöglicht nun die Entwicklung neuer Therapieformen auf genetischer Ebene. Während bei der Gentherapie zusätzliche genetische Information in die Zelle eingefügt wird, zielt die Anwendung von Antisense-Oligonukleotiden auf eine spezifische Hemmung der Bildung von Zielproteinen. Obwohl das Wirkprinzip von Antisense-Oligonukleotiden erstmals schon 1978 gezeigt werden konnte [Zamecnik and Stephenson, 1978], ist es bis heute nicht vollständig gelungen, die methodischen Hürden hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung zu überwinden.

### **1.3.1 Antisense-Oligonukleotide (ASO)**

Ein Antisense-Oligonukleotid ist eine kurzkettige synthetische Nukleinsäure einzelsträngiger DNA oder RNA mit einer frei wählbaren Abfolge von Basen, die als Sequenz-spezifische Inhibitoren der Genexpression wirken. Ein Antisense-Oligonukleotid bindet über komplementäre Basenpaarung an eine Nukleinsäure, deren Basenabfolge dazu exakt passt (Sense-Nukleinsäure). Durch die spezifische

Bindung des Antisense-Oligonukleotids an die komplementäre Sequenz der RNA des Zielproteins wird die Bildung des Zielproteins verhindert (Abbildung 1.3). Während dem Wirkmechanismus zahlreicher Arzneimittel die Hemmung der Funktion von Proteinen zugrunde liegt, greift das Prinzip der Antisense-Technik an der Bildung dieser Proteine an.

Abbildung 1.3: Antisense-Wirkung; entnommen aus [Jansen and Zangemeister-Wittke, 2002]



ASO sind potenzielle Arzneistoffe zur Behandlung von Krebserkrankungen, viralen Infektionen und genetisch bedingten Krankheiten. Diverse Vertreter dieser Arzneistoffklasse befinden sich derzeit in den verschiedenen Phasen der Klinischen Prüfung und werden voraussichtlich innerhalb der nächsten Jahre Marktreife erlangen [Jansen and Zangemeister-Wittke, 2002]. Aufgrund der Instabilität der Oligonukleotide gegen degradierende körpereigene Exo- und Endonukleasen sind die in den klinischen Prüfungen befindlichen Arzneistoffe in chemischer Weise meist an ihrem Phosphat-Zucker-Gerüst modifiziert. Ein weiterer Nachteil der unmodifizierten Oligonukleotide besteht in ihrer geringen Membrangängigkeit, was eine geringe Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe zur Folge hat.



Um die sehr geringe Stabilität der ASO gegenüber Nukleasen *in vitro* und *in vivo* und die bisher niedrige intrazelluläre Penetration zu erhöhen, stehen verschiedene Methoden zu Verfügung:

- 1) Elektroporation: wenig geeignet für mögliche Therapien
- 2) Intrazelluläre Mikroinjektion: nicht geeignet für mögliche Therapien
- 3) chemische Modifikation:
  - a) Schutz gegen enzymatische Degradation
  - b) Verbesserung der zellulären Aufnahme
- 4) Trägersysteme:
  - a) Nanopartikel
  - b) Liposomen
  - c) virale Vektoren

### 1.3.1.1 Chemische Modifikation der ASO

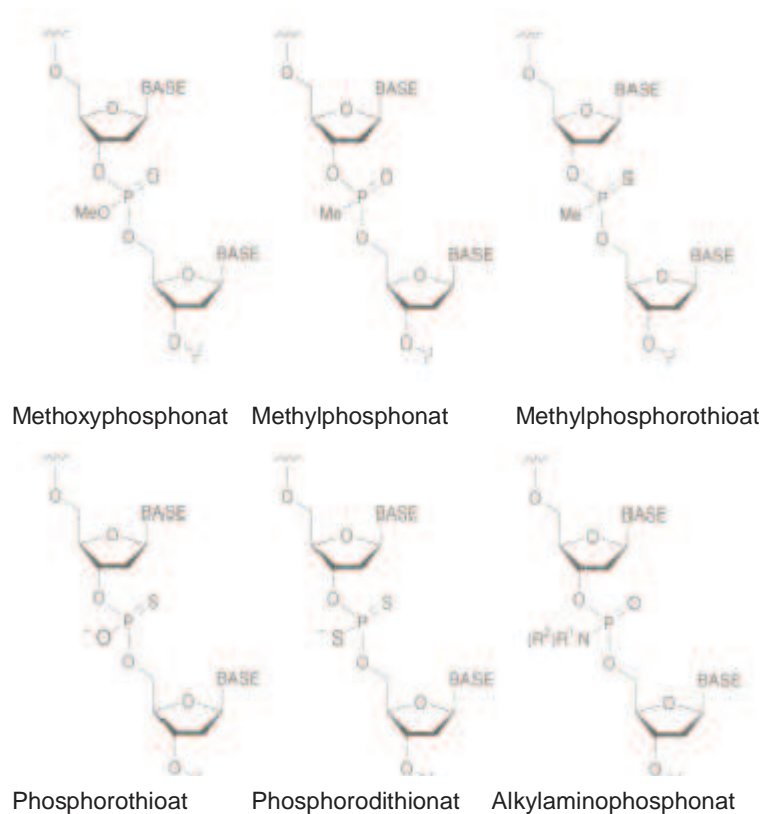
Weltweit werden große Anstrengungen unternommen, modifizierte Oligonukleotide darzustellen, die stabil sind gegenüber Nukleasen und die Zellmembranen überwinden können (Abbildung 1.4). Hierzu gehören die Phosphorothioate (PTO), die  $\alpha$ -anomeren Oligonukleotide, die Methylphosphonate und andere nichtphosphat-verbrückte Oligonukleotide. Darüber hinaus versucht man, Oligonukleotide mit stärkeren Bindungsaffinitäten durch Verknüpfung mit anderen, sehr fest DNA bindenden Verbindungen, darzustellen.

#### Phosphorothioate und Phosphorodithioate:

Die wichtigste dieser Modifikationen ist die sogenannte Phosphorothioat-Modifikation (PTO). Dabei wird ein Sauerstoffatom im Phosphat durch ein Schwefelatom ersetzt. Hierdurch wird ein neues chirales Zentrum gebildet. Das führt dazu, dass 2n Diastereomere entstehen. Leider besitzen diese Diastereomere unterschiedliche Paarungseigenschaften. Jedoch nahezu alle Studien wurden mit Diastereomer-Gemischen durchgeführt, obwohl die verschiedenen Diastereomere verschiedene Wirksamkeiten aufweisen, was auch an ihrer unterschiedlichen Nuklease-Stabilität liegen kann.



Abbildung 1.4: Möglichkeit der chemischen Modifikation der Nukleinsäurestruktur



Durch die Verwendung der entsprechenden Phosphorodithionate kann dieses Problem umgangen werden. Diese Veränderung hat dazu geführt, dass die Oligonukleotide wesentlich stabiler gegenüber hydrolytisch aktiven Enzymen sind. Auch die Aufnahme in die Zelle konnte verbessert werden, obwohl es sich immer noch um Polyanionen handelt.

Phosphorothioate besitzen allerdings den Nachteil der Plasmaproteinbindung und führen, besonders in hohen Konzentrationen, zu Sequenz-unspezifischen Nebeneffekten.

#### Methylphosphonate:

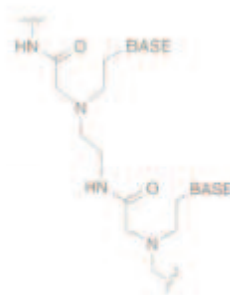
Diese komplett nichtionischen Verbindungen gelangen gut durch die Zellmembran. Sie sind zwar relativ basenlabil aber ausgesprochen hydrolysestabil in Gegenwart von Nukleasen. Leider tritt erneut das Diastereomer-Problem auf. Die Verbindungen bilden sehr stabile Duplexe und Triplexen, da die Abstoßung der negativen Ladungen im Rückgrat aufgehoben ist. Sie aktivieren jedoch nicht die RNase H. Des Weiteren bringen die Methylphosphonate aufgrund ihrer wesentlich geringeren Wasserlöslichkeit weitere praktische Probleme mit sich. Die neutralen Modifikationen weisen

zwar gegenüber geladenen Nukleinsäure-Derivaten eine verbesserte Zellmembran-permeabilität auf; diese ist aber immer noch zu gering, um intrazellulär biologische Wirkkonzentrationen zu erreichen. Bei neutralen Nukleinsäure-Derivaten können kationische Liposomen nicht als Trägersysteme genutzt werden, da keine ionische Wechselwirkung vorliegt und diese für die Verkapselung in die Liposomen notwendig zu sein scheint [Ghosh and Iversen, 2000].

### Nichtphosphat verbrückte Oligonukleotide:

In jüngster Zeit wurde eine Reihe von Oligonukleotiden dargestellt, in denen die Phosphordiester-Bindungen komplett ersetzt worden sind. Für viel Aufregung hat die Entdeckung gesorgt, dass auch Oligonukleotide stabile Duplexe und Triplexen bilden können, in denen auch die Ribose- oder Deoxyribose -also die Zuckereinheit- ganz durch ein Peptid-Rückgrat ersetzt worden ist (Abbildung 1.5). Diese als PNA (Peptid-Nucleic-Acid) bezeichneten Verbindungen sind momentan große Hoffnungsträger, da sie äußerst stabil sind und stabilere Komplexe bei der Hybridisierung mit der Ziel-mRNA als herkömmliche ASO eingehen.

Abbildung 1.5: Darstellung der heute sehr wichtigen Peptidnukleinsäuren auch PNA genannt; Oligonukleotid ohne Phosphatrückgrat.



Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Modifizierung der Oligonukleotide allein bisher nicht zur Entwicklung therapeutisch nutzbarer, spezifischer Antisense-Wirkstoffe geführt hat. Deshalb stellt die Verwendung von Transfersystemen für Antisense-Oligonukleotide einen erfolgversprechenden Ansatz dar, um spezifisch wirksame Nukleinsäurederivate mit einer Nuklease-Protektion zu versehen und therapeutisch einsetzbar zu machen.

### 1.3.1.2 Sequenz-unspezifische Wirkung von ASO

Die Wirksamkeit von ASO in Zellkultur und *in vivo* ist gut belegt. Allerdings wurden neben der gezielten Sequenz-spezifischen Hemmung der mRNA zusätzlich weitere Wirkungen von ASO nachgewiesen, die unabhängig von dem Antisense-Effekt auftreten. Diese Sequenz-unspezifischen Wirkungen von Oligonukleotiden beruhen auf deren Bindung an Proteine. Die Bindung von ASO an einzelne Proteine kann abhängig oder unabhängig von der Basenabfolge des Oligonukleotids auftreten. Die dadurch entstehenden Sequenz-unspezifischen Effekte werden von der Art der chemischen Modifikation des Oligonukleotids beeinflusst. Die Gesamtwirkung eines Oligonukleotids setzt sich aus beiden Komponenten, Sequenz-spezifischen und Sequenz-unspezifischen Effekten, zusammen.

Die Charakterisierung von Sequenz-unspezifischen Effekten ermöglicht das Vermeiden von Basenabfolgen und Modifikationen, die unerwünschte Wirkungen von Oligonukleotiden verursachen, zum Beispiel kommt in bakterieller DNA die Zweiersequenz Cytidin-Base mit darauffolgender Guanidin-Base (CpG-Dinukleotid) häufig vor. In der DNA von Wirbeltieren ist diese Zweiersequenz weniger häufig und durch Anlagerung einer Methylgruppe an der Base Cytidin verändert (im Gegensatz zu nicht methylierter bakterieller DNA). Wirbeltiere erkennen mit Hilfe der Toll-like-Rezeptoren diesen Unterschied in der Basenzusammensetzung von DNA [Zuany-Amorim et al., 2002]. Bei Wirbeltieren führt die Erkennung von bakterieller DNA zu der Aktivierung einer unspezifischen Immunantwort. Die immunstimulierende Eigenschaft bakterieller DNA kann von synthetischen Oligonukleotiden imitiert werden, die CpG-Dinukleotide enthalten und deren Basen nicht methyliert sind.

### 1.3.1.3 Klinische Studien

Erste klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden zeigen therapeutische Effekte bei weitgehend guter Verträglichkeit. Obwohl diese Studienergebnisse mit Zurückhaltung interpretiert werden müssen, ist anzunehmen, dass Antisense-Oligonukleotide längerfristig die Pharmakotherapie um ein grundsätzlich neues Wirkprinzip bereichern werden. Bisher ist nur Vitravene™ bei AIDS-Kranken als Antisense-Medikament gegen Cytomegalie-Virus (CMV)-Augeninfektionen zugelassen. Darüber hinaus sind jedoch viele Antisense-Wirkstoffe in verschiedenen Phasen der Klinischen Prüfung [Jansen and Zangemeister-Wittke, 2002]. Die wichtigsten klinischen Studien sind auf den Internetseiten der Firmen ISIS

Pharmaceuticals (<http://www.isispharm.com/>), Hybridon (<http://www.hybridon.com/>) und Genta (<http://www.genta.com/>) zusammengefasst.

Bei inflammatorischen, onkologischen und viralen Erkrankungen sind Proteine bekannt, die wesentlich zur Pathogenese der jeweiligen Erkrankung beitragen. So führt bei **inflammatorischen Erkrankungen** die Hemmung der Bildung proinflammatorischer Zytokine und leukozytärer/endothelialer Adhäsionsmoleküle zu einer Verminderung der unerwünschten Entzündungsreaktion. Beispielsweise wurde für das proinflammatorische Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) eine zentrale Mediatorfunktion bei akuten und chronisch entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen [Eigler et al., 1997]. Hohe Blutkonzentrationen von TNF $\alpha$  wurden unter anderem bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, Multiple Sklerose und Psoriasis beobachtet. Die Synthese von TNF $\alpha$  kann mit ISIS 104838 (ISIS Pharma), ein Antisense-Oligonukleotid der zweiten Generation (2'-O-methoxyethyl-Modifikation), spezifisch gehemmt werden. In einer ersten Klinischen Phase I-Studie erhielt man ein gutes Dosierungsprofil. Unter den leukozytären Adhäsionsmolekülen besitzt ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) eine zentrale Bedeutung bei der Bindung verschiedener Entzündungszellen untereinander und an das Gefäßendothel. Mit der Hemmung der Expression von ICAM-1 durch Antisense-Oligonukleotide ist daher ein entzündungshemmender Effekt zu erwarten (Einsatz von Alicaforsen bei Colitis Ulcerosa). Bei Patienten mit Morbus Crohn wird die Wirksamkeit des Antisense-Oligonukleotids ISIS 2302 (Alicaforsen, ISIS Pharma) gegen das Adhäsionsmolekül ICAM-1 untersucht. In einer Placebo-kontrollierten Phase-II-Studie an Patienten mit therapierefraktärem Morbus Crohn wurde ISIS 2302 einen Monat lang jeden zweiten Tag als Infusion gegeben. Es zeigte sich eine signifikante Einsparung an Steroiden in der behandelten Gruppe. Eine multizentrische Phase-III-Studie (Nordamerika, Europa, Israel) soll nun diese positiven Effekte bestätigen.

Bei **Tumorerkrankungen** tragen in der Regel mehrere proliferationsfördernde Proteine (Onkogene) parallel zum Wachstum eines Tumors bei. Deshalb ist die Hemmung einzelner onkogener Proteine wenig erfolgversprechend. Bestimmte Proteinkinasen spielen jedoch eine übergeordnete Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Zellen. Bei Leukämie-Zell-Linien führt die Hemmung der Proteinkinase A1 mit einem Antisense-Oligonukleotid (GEM231, Hybridon) zu einer Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der Expression der Proteinkinase A2. Damit verbunden ist eine Hemmung der Proliferation und eine

zunehmende Differenzierung der Tumorzellen. Auch für die Hemmung der Expression der Proteinkinasen-C-alpha mit Antisense-Oligonukleotiden konnte eine Verminderung des Wachstums von verschiedenen tierexperimentellen Tumoren nachgewiesen werden. Ein Proteinkinase-C-alpha-Inhibitor ist LY900003 (Affinitak™, ISIS Pharma/ Eli Lilly), der in Kombination mit anderen Zytostatika (Carboplatin und Paclitaxel) additive oder synergistische Effekte aufweist. Affinitak™ wurde bereits in mehreren Studien untersucht (Klinische Phase III). In Kombination mit klassischen Zytostatika konnte die Überlebenszeit bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom deutlich verlängert werden.

Das Apoptose-Schutzprotein bcl2 ist in den meisten Tumoren überexprimiert und wurde in präklinischen Studien mit zahlreichen Zytostatika kombiniert. Die Hemmung von bcl2 mit einem Antisense-Oligonukleotid (Genasense™, Genta) hat in einer nicht kontrollierten Studie an einer kleinen Gruppe von Patienten (n = 9) mit therapierefraktärem Non-Hodgkin-Lymphom bei einem Patienten zu einer kompletten Remission geführt [Webb et al., 1997]. Bei einem weiteren Patienten zeigte sich eine Verringerung des Tumorzellvolumens. Zur Dokumentation des Wirkmechanismus konnte bei zwei von neun Patienten eine Verminderung der bcl2-Expression nachgewiesen werden. Randomisierte Studien in Phase III werden an Patienten mit chronischer lymphozytärer Leukämie, malignem Melanom und multiplem Melanom durchgeführt.

#### **1.3.1.4 Perspektiven**

Insgesamt ist zu erwarten, dass therapeutische Oligonukleotide für ausgewählte Indikationen in absehbarer Zeit Eingang in die Klinik finden werden. International, mit Schwerpunkt in den USA, Kanada und der Schweiz, arbeiten zahlreiche biotechnologische Unternehmen an der Entwicklung von Oligonukleotiden als neuen Therapeutika. In Deutschland zählen dazu die Forschungsabteilungen der Unternehmen Byk Gulden, Aventis und Boehringer Ingelheim. Allerdings werden erst weitere klinische Studien zeigen, ob bestimmte Antisense-Oligonukleotide den heute etablierten Therapieformen tatsächlich überlegen sind.

Das Konzept einer zielgerichteten Hemmung der Bildung krankheitsverursachender Proteine mit Antisense-Oligonukleotiden zeigt in klinischen Studien bei viralen, inflammatorischen und Tumorerkrankungen erste positive Ergebnisse. Die Wirksamkeit eines Antisense-Oligonukleotids gegen die CMV-Retinitis bei AIDS-Patienten ist nachgewiesen. Die Untersuchungen bei Patienten mit Morbus Crohn

und mit Non-Hodgkin-Lymphom wurden bisher an kleinen Patientenkollektiven durchgeführt und müssen noch in größeren Studien bestätigt werden.

Oligonukleotide mit verbesserten Eigenschaften sind in der Entwicklung. Die chemischen Modifikationen dieser Oligonukleotide gewährleisten sowohl eine höhere Affinität an die Ziel-RNA als auch eine höhere Stabilität gegenüber Nukleasen. Damit verbunden ist eine Verstärkung der spezifischen Antisense-Wirkung und eine Verminderung von begleitenden unerwünschten Sequenz-unspezifischen Effekten. Trotzdem sind viele der Oligonukleotide nicht als Medikamente einsetzbar. Als Polyanionen sind sie nicht in der Lage, die hydrophobe Zellmembran zu überwinden. Eine Alternative könnte der Einsatz partikulärer Trägersysteme für unmodifizierte Oligonukleotide darstellen, um ihre Stabilität zu erhöhen und die Penetration der geladenen Arzneistoffe durch Zellmembranen zu erleichtern.

### **1.3.2 Einsatz von Nanopartikeln in der ASO-Therapie**

Durch Verwendung bestimmter Trägersysteme wie den Nanopartikeln (NP) kann eine Verbesserung der Transfektion und eine für die Wirkung der Antisense-Oligonukleotide (ASO) günstigere intrazelluläre Verteilung erreicht werden. Aufgrund des hydrophilen und polyanionischen Charakters der ASO bestehen geringe Wechselwirkungen zwischen ASO und Polymeren. Daher werden zur Verkapselung in oder Assoziation an NP zwei verschiedene Strategien angewendet:

- 1) ASO werden an ein hydrophobes Molekül gebunden (ASO-Konjugate). Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen Polymerbestandteilen der NP und ASO-Konjugaten (Adsorption) oder einer Lösungsvermittlung des ASO-Konjugats in die Matrix der NP (Inkorporation).
- 2) Kationische Polymere werden verwendet, um NP zu überziehen oder positive Ladungen in NP einzubringen. Hierbei kommt es zu ionischen Wechselwirkungen mit den negativ geladenen ASO [Chavany et al., 1992; Godard et al., 1995; Fattal et al., 1998].

Unmodifizierte Oligonukleotide (ODN) und Phosphorothioate (PTO) wurden erfolgreich an die verschiedensten NP gebunden. Die am häufigsten verwendeten Polymere sind Albumin, Gelatine, PEG-Polymilchsäure (PEG-PLA-Konjugate), Polybutylcyanoacrylat (PBCA), Polyisohexylcyanoacrylat (PIHCA), Polyhexylcyanoacrylat (PHCA) und Protamin.

### 1.3.2.1 Kationische Reagenzien als Hilfsstoffe

Polyalkylcyanoacrylat-NP werden meist durch sterische Effekte des Dextran stabilisiert. Dextran ist zwar biokompatibel, aber ein Nachteil ist, dass die verfügbaren Hydroxylgruppen wenig geeignet sind für eine chemische Modifikation. Außerdem löst sich Dextran mit der Zeit aus der NP-Matrix. Daher dient als kationisches Polymer **Diethylaminoethyl- (DEAE)-Dextran**, was auch als Transfektionsbeschleuniger bekannt ist [Zobel et al., 1997]. **Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)** ist ein Detergens. Es wurde bisher schon mit PIBCA- oder PIHCA-NP kombiniert und dient als Adsorptionsbeschleuniger für hydrophile anionische ASO [Chavany et al., 1992].

Die Beladung von NP durch die Ausbildung von ASO-Kation-Komplexen hängt von vielen Faktoren ab:

- Kettenlänge der ASO
- Eigenschaften des Basispolymers
- Hydrophobizität des Kations, das als Ionenpaarbildner für das ASO verwendet wird
- die Ionenstärke des verwendeten Mediums [Chavany et al., 1992]

In Studien von Zobel et al. [1997] konnte gezeigt werden, dass ASO an PHCA-NP entweder mit DEAE-Dextran oder in Kombination mit lipophilen Ionenpaar-Verbindungen, wie zum Beispiel CTAB gebunden werden können.

Werden ASO/CTAB-Komplexe an PIBCA-NP adsorbiert, kommt es zu einer Neutralisation der ASO-Ladung durch CTAB, dadurch werden die NP instabil und die sterische Stabilisierung durch Dextran ist nicht mehr ausreichend. Bei großen Mengen von ASO wird das Zetapotential wieder negativ und die NP wieder stabiler [Lambert et al., 1998]. Wenn ODN mittels CTAB an PIHCA-NP adsorbiert werden, werden ODN effizient gegen enzymatischen Abbau geschützt, sogar nach 5 Stunden Inkubation mit Phosphodiesterasen oder in Zellkulturmedium [Chavany et al., 1992]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Zobel et al. mit an DEAE-Dextran-PBCA-NP adsorbierten ODN, die mit DNase inkubiert wurden [Zobel et al., 1997]. Es wird auch angenommen, dass eine Adsorption von Plasmaproteinen an NP einen schützenden Effekt besitzt. ODN-DEAE-NP-Komplexe sind stabiler im Zellkulturmedium, das 10% FCS enthält, als ODN, die mit Hilfe von CTAB an NP adsorbiert wurden. Der



geringeren Stabilität der CTAB-ODN-NP liegt vermutlich eine Verdrängung des CTAB durch Plasmaproteine zugrunde [Chavany et al., 1994; Nakada et al., 1996]. Diese Verdrängung konnte in Gegenwart eines konzentrierten Mäuseplasmas (70%) bestätigt werden. Sowohl freie als auch an NP gebundene ODN werden sehr schnell abgebaut; die Bindung an NP scheint den ODN jedoch einen Schutz vor den Nukleasen zu geben.

Um die Bindung an eine Zellmembran zu ermöglichen, wurde versucht die ASO hydrophober zu machen [Godard et al., 1995]. In einem Ansatz wurden Phosphonium- bzw. Ammoniumsalze verwendet, die gleichzeitig die negative Ladung neutralisieren und an die ASO hydrophobe Reste anbringen. Diese Salze verbesserten die zelluläre Aufnahme nicht. Außerdem zeigte es sich, dass CTAB und Hexadecyltributylphosphoniumbromid bei einer Konzentration von mehr als 1µM eine starke zytotoxische Wirkung in Zellkulturen entfalten.

### **1.3.2.2 Konjugation des ASO an ein hydrophobes Molekül**

Mit Hilfe chemischer Abkömmlinge von ASO können die beiden größten Probleme, die Instabilität in biologischen Medien und die geringe Penetration der ASO durch die Membranen der Zellen vermindert werden. Die ASO werden mit sperrigen, geladenen oder hydrophoben Resten konjugiert. Cholesterol, Phospholipide [Filion and Phillips, 1997], Dodecanol-Ketten, Alkylgruppen, Porphyrine, Polykationen, Proteine, Peptide [Emile et al., 1996] oder ihre Derivate wurden bisher verwendet, um ASO an den terminalen Enden zu modifizieren [Godard et al., 1995].

In Abwesenheit von CTAB binden unmodifizierte ODN nicht an PIHCA-NP, während 60% eines Cholesterol-ODN-Konjugats adsorbiert werden [Godard et al., 1995]. Die niedrigere Ladungskapazität der Cholesterol-ODN-Konjugate in Vergleich zu CTAB-ODN-Adsorbaten lässt sich durch eine möglicherweise elektrostatische Abstoßung zwischen gebundenen geladenen ODN-Molekülen und negativ geladenen NP erklären.

Bei Cholesterol-ODN-Konjugaten wird vermutlich der Cholesterolrest in die Zellmembran verankert und es erfolgt wahrscheinlich über eine nicht Rezeptor-vermittelte Endozytose eine Internalisierung des Konjugats in ein Endosomen-ähnliches Vesikel. Innerhalb der Zelle verbleiben die Konjugate jedoch in den Endosomen. Sie werden innerhalb einer sechsständigen Inkubationszeit nicht abgebaut [Boutorine and Kostina, 1993].



Die niedrigere biologische Aktivität der mit Cholesterol modifizierten ODN wird zum einen erklärt durch eine zusätzliche Interaktion zwischen Cholesterolrest und Zellmembran während der Penetration und des Transports, zum anderen durch eine Destabilisierung des komplementären Komplexes mit der mRNA infolge des hydrophoben Cholesterolrestes [Godard et al., 1995]. Eine andere Formulierung mit an PIHCA-NP gebundenen Cholesterol-ODN-Konjugaten ermöglichte eine spezifische Inhibition der Proliferation von kultivierten menschlichen T24 Blasenkarzinomzellen [Godard et al., 1995].

### **1.3.2.3 Adsorption des ASO an die Partikeloberfläche**

Kationische Polystyren (PS)-NP eignen sich für die Beladung von ASO. Vergleicht man die Beladung von negativ und positiv geladenen modifizierten PS-NP, beobachtete man, dass selbst bei negativ geladenen Partikeln eine Adsorption festgestellt werden konnte [Elaissari et al., 1994]. Eine wichtige Rolle beim Adsorptionsprozess scheinen daher nicht nur elektrostatische Kräfte, sondern ebenso hydrophobe Bindungskräfte zu spielen [Elaissari et al., 1994; Ganachaud et al., 2000].

Es erfolgt eine rasche Adsorption der ASO an die PS-NP; 70% der Endadsorption ist in den ersten Minuten erreicht. Eine weitere Adsorption der ASO wird durch eine reduzierte Diffusion der ASO zu der Partikel-Zwischenphase verhindert, da sich freie und adsorbierte ASO elektrostatisch abstoßen. Die Beladung von mit Aminogruppen modifizierten PS-NP mit ASO ist vom pH-Wert abhängig. Wird der pH-Wert über den pKs der Aminogruppen angehoben, nimmt die Adsorption von ASO an NP ab. Andererseits wird bei einem niedrigen pH-Wert mehr ASO adsorbiert, da die kationische Oberflächenladung bei einem saurem pH zunimmt [Elaissari et al., 1994]. Die Aufnahme der ASO bei einem basischen pH-Wert ist trotzdem bemerkenswert. Die maximale Menge an adsorbierten ASO wird theoretisch erreicht, wenn die ASO eine dichtgepackte Monoschicht auf der NP-Oberfläche bilden. Das würde bedeuten, dass die ASO nicht in der zylindrischen Konformation vorliegen. Diese Konformation wäre jedoch nicht die geeignetste für die spätere Hybridisierung mit der komplementären Sequenz [Ganachaud et al., 2000].

Des Weiteren untersuchten Zobel et al. [Zobel et al., 1999] verschieden substituierte Aminoalkylacrylat-Derivate als Basismaterial für NP. Die Ladungskapazität nimmt mit steigendem Anteil an basischem Polymer im Copolymer zu. Die Substitution der Aminogruppen mit Methylgruppen führt zu einer höheren Adsorption an ODN und

einer reduzierten Zytotoxizität. NP mit einer quartären Ammoniumstruktur zeigen eine pH-Wert-unabhängige Ladungseffizienz; doch wirkt sich eine permanente positive Ladung ungünstig auf die Zytotoxizität aus. Als optimales Monomer bezüglich der Biokompatibilität und der Trägereigenschaften für hydrophile anionische ASO stellte sich in dieser Studie Monomethylaminoethyl-methacrylat (MMAEMA) heraus.

### **1.3.2.4 Inkorporation des ASO in die Partikelmatrix**

Eine weitere Möglichkeit stellt die Komplexierung des ASO und die anschließende Inkorporation in die Partikelmatrix dar. ASO weisen eine starke Bindung zu Oligopeptiden mit Lysinresten auf (Polylysin). Emile et al. zeigten, dass diese ODN-Komplexe fähig sind, Copräzipitate mit den PLA-PEG-Copolymer zu bilden [Emile et al., 1996]. In gleicher Weise können PLA-NP mit ASO beladen werden. Nach Komplexierung mit CTAB wird der ASO-Komplex in die Partikelmatrix stabil eingebaut [Delie et al., 2001]. Je nach verwendeter Herstellungsmethode werden die ASO schnell oder verzögert freigesetzt. PLA-NP, die durch die Doppelemulsions-technik hergestellt werden, können in der wässrigen Phase ASO beinhalten. Vorteilhaft ist, dass für die Beladung der NP keine weiteren toxischen Hilfsstoffe notwendig sind [Berton et al., 1999].

Protamin, ein polykationisches Peptid (MW = 4000-4500Da), wurde als möglicher Penetrationsbeschleuniger für ODN untersucht [Junghans et al., 2000; Gonzalez Ferreira et al., 2001]. Die Stabilität der ODN gegenüber Nukleasen und die Förderung der zellulären Aufnahme ist erhöht; nach 24h Inkubation mit nicht hitzeinaktiviertem FCS sind noch 60% der gebundenen ODN intakt. Darüber hinaus wurden von Junghans et al. [Junghans et al., 2001] aus kationischen Peptiden (Spermin, Spermidin) erfolgreich ASO-beladene Partikel hergestellt.

Erfolgreich können ASO in die Matrix von Albumin-Nanopartikeln eingebunden und vor enzymatischen Abbau geschützt werden [Arnedo et al., 2002; Arnedo et al., 2004]. Im Vergleich zu ASO gebunden an die Oberfläche von Albumin-Nanopartikeln kommt es nach Einbau in die Matrix zu einem verbesserten Schutz vor Abbau.

### **1.3.2.5 Testung in Zellkulturversuchen**

Nachdem die Partikel in das lysosomale Kompartiment der Zelle aufgenommen worden sind, werden sie dort in niedrigmolekulare lösliche Verbindungen abgebaut und vom Körper renal eliminiert. Um eine Anreicherung im lysosomalen System zu

verhindern und damit sicherzustellen, dass ASO ins Zytoplasma gelangen, können einige Substanzen zugesetzt werden, die die lysosomale Membran destabilisieren. Dazu gehören zum Beispiel kationische Detergentien oder kationische hydrophobe Peptide [Chavany et al., 1992; Emile et al., 1996].

Es wird vermutet, dass der Zusatz von CTAB als quartärem Ammoniumsalz die lysosomale Membran destabilisiert [Zobel et al., 1997]. Zobel et al. ersetzten das CTAB durch ein DEAE-Dextran-Konjugat. Dadurch wird eine höhere Aufnahme von ODN in die Zellen erreicht. Die zelluläre Aufnahme der NP erfolgt durch einen endozytotischen Prozess. Eine Membrandestabilisierung konnte bei NP, die ASO mit DEAE-Dextran komplexierten, nicht beobachtet werden. Diese NP verblieben in den Phagolysosomen.

Die Bildung von Ionenpaaren zwischen an PIBCA- oder PIHCA-NP gebundenen ODN und quartären Ammonium-Verbindungen verhindert einen Angriff der Nukleasen an ODN im Zellkulturmedium und erhöht ihre zelluläre Aufnahme. CTAB als quartäres Ammoniumion destabilisiert die lysosomale Membran, was die Freigabe von ODN in das Zytoplasma ermöglicht [Fattal et al., 1998].

Wird ein basisches Polymer (MMAEMA) zur Adsorption von ODN verwendet, so hängen die toxischen Einflüsse auf die Integrität der Zellmembranen von den Aminoalkylgruppen auf der Partikeloberfläche ab (Nachweis über MTT-Test oder Haemolyse). Die zytotoxischen Effekte nehmen mit der Anzahl der Verlängerung der N-Alkyl-Seitenketten des Polymers zu. Die ODN wurden signifikant vor dem enzymatischen Abbau geschützt, die zelluläre Aufnahme von ODN-beladenen Aminoalkylacrylat-Derivat-NP in Vero-Zellen war beschleunigt [Zobel et al., 1999].

Die Studie von Berton et al. [Berton et al., 1999] beschäftigt sich mit der intrazellulären Aufnahme von mit PTO-beladenen NP aus Polymilchsäure. Die intrazelluläre Verteilung auf die verschiedenen Zellkompartimente ist in DU145-Zellen anhand von Fluorescein-markierten Phosphorothioat untersucht worden. Nach Zugabe des Säure-Inhibitors Monensin konnte bei freien PTO eine Zunahme der Fluorescein-Signalintensität beobachtet werden, was anzeigt, dass freie PTO in der sauren intrazellulären Umgebung liegen, während PTO aus Nanopartikeln nicht im sauren Kompartiment gefunden wurden. Freie PTO und mit PTO-beladene NP strömten aus DU145-Zellen aus 2 verschiedenen intrazellulären Kompartimenten aus. Die Verwendung von NP stellt somit eine Möglichkeit zum Einschleusen von PTO in Zellen dar und verändert auch die zelluläre Lokalisation der PTO [Berton et al., 1999]. Die Messung der Signalintensität und deren Auswertung erscheint jedoch

fragwürdig. Die Testung in einer lymphozytären Zell-Linie mit CTAB komplexierten PTO-beladenen PLA-NP führte zu einer starken Konzentrations-abhängigen Inhibition der viralen Produktion im nanomolaren Bereich [Berton et al., 2001].

Die Aufnahme eines 15-mer Oligothymidilats, das an PIHCA-NP adsorbiert wurde, wurde unter nicht toxischen Bedingungen in U937 Zellen untersucht [Chavany et al., 1994]. Die Aufnahme der ODN nahm drastisch zu, wenn sie an die NP gebunden waren. Bei niedrigeren Temperaturen (4°C) war sie reduziert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es sich bei der Aufnahme um einen aktiven endozytotischen/phagozytotischen Prozess handelt und das Trägersystem nicht nur an die Zelloberfläche adsorbiert wird. Bestätigt wurde dies durch konfokale Mikroskopie mit Fluoreszenz-markierten NP: nach der Internalisierung akkumulierten NP in den Phagosomen oder Lysosomen. Diese intrazelluläre Verteilung hat allerdings einen alsbaldigen Abbau der ODN zur Folge.

Die Aufnahme von Protamin-NP in die Zellen erfolgt über eine aktive Endozytose [Junghans et al., 2000]. Dies wurde durch Kontrollversuche bestätigt, die bei 4°C durchgeführt wurden: bei niedrigen Temperaturen konnte keine Aufnahme in die Zelle beobachtet werden. Das Fluorescein-markierte ASO wurde in der Zelle hauptsächlich im Zytosol so wie Zellkern detektiert [Junghans et al., 2001].

Albumin-NP wurden mit ODN und mit PTO-beladen. Die Testung in einem viralen Assay dieser Partikel erbrachte eine gleich gute Wirkung von PTO wie ODN, während Kontrollzubereitungen mit PTO dem ODN überlegen war [Arnedo et al., 2004].

Durch die verbesserte Zellaufnahme gelang es, mit den verschiedenen Nanopartikeln die Wirksamkeit des ASO zu erhöhen.

#### **1.3.2.6 Testung in Tiermodellen**

Nach intravenöser Gabe bei Mäusen wurde die Stabilität der ODN im Plasma verbessert und eine Anreicherung von ODN-PIBCA- und PIHCA-NP in der Leber gezeigt [Fattal et al., 1998]. In einer anderen pharmakokinetischen Studie mit PIBCA-NP konnte die Halbwertszeit von ODN im Blut nicht erhöht werden. Hauptsächlich fand eine Anreicherung in der Leber statt, die Aufnahme in die Milz war gering [Nakada et al., 1996]. Nach Anwendung einer Methode, bei der die verschiedenen Kettenlängen der ODN bestimmt werden können, zeigte sich, dass ODN in der Leber und im Plasma intakt vorlagen, wenn sie mit Hilfe von NP appliziert wurden [Schwab et al., 1994].

An PIHCA-NP mit CTAB adsorbierte ODN inhibieren spezifisch die Ha-*ras* vermittelte Zellproliferation und die Tumorentstehung nach subkutaner Injektion in Nacktmäusen [Schwab et al., 1994]. Es wurde gezeigt, dass die Stabilität und die zelluläre Aufnahme durch Adsorption an PIHCA-NP verbessert werden kann. Eine Inhibition der Zellproliferation von Zellen, die das punktmutierte Ha-*ras* Gen exprimieren, konnte mit einer 100fach geringeren Konzentration als mit den freien ODN erreicht werden.

Die Anreicherung in der Leber nach intravenöser Applikation wird genutzt, um zielgerichtet mit einer ASO-Therapie Leberkrankheiten zu bekämpfen [Bijsterbosch et al., 2001]. Oberflächen-modifizierte LDL-Partikel wurden mit einem Cholesterol-ASO-Konjugat beladen. Durch eine spezifische Internalisierung über den Galaktose-spezifischen Rezeptor werden hohe Konzentrationen nach Applikation in Ratten in der Leber erreicht.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit ASO-beladene Albumin-NP zur Anwendung in der Brustkrebstherapie entwickelt. Zunächst wurde die Beladung von Albumin-NP mit ASO optimiert. Im Anschluss wurden diese NP-Zubereitungen in der Zellkultur auf biologische Aktivität getestet. Weiterhin wurde die Oberfläche der NP durch Konjugation mit einem anti-HER2-Antikörper modifiziert, um ein aktives Targeting von HER2-überexprimierenden Brustkrebszellen zu erlangen.

Die Verwendung von Albumin-NP als Träger für ASO bietet eine Anzahl an Vorteilen. Albumin-NP besitzen die Fähigkeit ASO ohne weiteren Zusatz von möglichen toxischen Hilfsstoffen zu binden. NP aus humanem Serumalbumin (HSA) werden als körpereigene Substanz gut toleriert. Es kommt nicht zu einer unerwünschte Akkumulation des Trägersystems im Körper, da Albumin-NP vom Körper abgebaut werden. Darüber hinaus können Albumin-NP die intrazelluläre Aufnahme von ASO fördern und die ASO zu ihrem Wirkort transportieren. Durch die vorhandenen funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche der Albumin-NP kann nach einer erfolgreichen Beladung mit ASO ein monoklonaler Antikörper oder Ligand für ein spezifisches Targeting leicht aufgebracht werden. Dadurch wird das Problem des unspezifischen Targetings bei intravenöser Gabe der HSA-NP-Zubereitung umgangen und eine spezifische Anreicherung von ASO-NP kann im Tumorgewebe erhöht werden.

NP aus humanem Serumalbumin (HSA) stellen einen möglichen Ansatz in der ASO-Therapie dar. Ein zielgerichtetes Targeting an den HER2-Rezeptor wird mit einem spezifischen Antikörper erreicht. Mit einer geeigneten Formulierung von HSA-NP könnte somit die Dosierung und die Nebenwirkungen von ASO erheblich reduziert werden.

## 2 Material und Methoden

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Durchführung der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Methoden. Sofern bei der Herstellung von Lösungen keine anderen Angaben gemacht sind, wurden diese in entmineralisiertem Wasser (MilliQ Wasser) hergestellt.

### 2.1 Herstellung von ASO-beladenen HSA-Nanopartikeln

Die Nanopartikel (NP) aus humanem Serumalbumin (HSA) wurden in Anlehnung an die Desolvationsmethode von Marty et al. [1978] und Weber et al. [2000a] hergestellt und hinsichtlich ihrer Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, nicht desolvatisiertem Anteil an HSA, der Partikelausbeute und des ASO-Gehaltes charakterisiert.

#### 2.1.1 Chemikalien und Geräte

|  |   |
|--|---|
| Ethanol reinst                                   | Merck, Darmstadt                        |
| Glutaraldehyd 25%                                | Merck, Darmstadt                        |
| Humanes Serumalbumin (Fraktion V)                | Sigma, Steinheim                        |
| Natronlauge 1N bzw. 0,1N                         | Merck, Darmstadt                        |
| Salzsäure 1N bzw. 0,1N                           | Merck, Darmstadt                        |
| Adsorptions- und Einbindungsversuchen:           | MWG, Ebersberg                          |
| - 15mer ODN bzw. PTO:                            | 5' tgt ctt ctt ttt tat 3'               |
| - 20mer ODN bzw. PTO:                            | 5' cta cga tct act ggc tcc at 3'        |
| - 20mer Cy5-PTO:                                 | Cy5 - 5' cta cga tct act ggc tcc at 3'  |
| Centrifuge 5417 D                                | Eppendorf, Engelsdorf                   |
| Microcon <sup>®</sup> 30.000, microconcentrators | Amicon, Beverly, USA                    |
| pH-Meter 766 Calimatic                           | Knick, Berlin                           |
| Ultraschallbad Transonic Digital                 | Elma, Singen                            |
| Variomag, Multipoint, Magnetrührplatte           | H+P Labortechnik AG,<br>Oberschleißheim |



### **2.1.2 Adsorptionsversuch von ASO an gelöstem HSA**

Der pH-Wert einer 2%igen HSA-Lösung wurde auf pH 5,5 bzw. 7,0 eingestellt. Ein Anteil von 41,3 µl einer ASO-Lösung (= 100 µg 15mer ODN oder PTO) wurde mit 330,0 µl dieser 2%igen HSA-Lösung (= 6,6 mg) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde das HSA mittels Ultrafiltration über eine Membran mit einer Ausschlussgröße von einem Molekulargewicht 30 kDa von ungebundenem ASO getrennt. Der ASO-Gehalt in den Ultrafiltraten wurde mittels Anionenaustauscher-HPLC bestimmt (siehe 2.5.2).

### **2.1.3 Optimierung der Partikelherstellung**

Ein Volumen von 330,0 µl einer 2%igen HSA-Lösung (= 6,6 mg) wurden mit einem entsprechendem Volumen an ASO-Lösung (= 100 µg ASO) inkubiert. Der Herstellungsprozess wurde optimiert durch die Variation verschiedener Parameter wie der Menge an Ethanol (330 µl; 450 µl; 600 µl; 900 µl) zur Desolvatation und der Zugabe einer 8%igen Glutaraldehydlösung (1,55 µl, 3,88 µl, 7,75 µl) zur Quervernetzung der Partikel. Darüber hinaus wurden alternative Aufreinigungsmethoden untersucht: (1.) Änderung der Menge an MQ-Wasser von 500 µl anstelle von 1000 µl, (2.) Verwendung von 50% Ethanol zum Redispergieren und (3.) Verringerung der Zentrifugationsgeschwindigkeit von 16.100 g auf 8.000 g für 10 min.

### **2.1.4 Standardprotokoll der ASO-Einbindung in HSA-NP**

Zunächst wurde zu 330,0 µl einer 2%igen HSA-Lösung pH 5,5 100 µg ASO hinzugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurde das Protein durch tropfenweise Zugabe von 900 µl Ethanol zu Nanopartikeln desolvatisiert. Zur Stabilisierung der partikulären Struktur wurde direkt im Anschluss an die Desolvatation 1,56 µl 8%ige Glutaraldehydlösung zugegeben.

Nach 24 h Rühren ( $500 \text{ U min}^{-1}$ ) wurden die Partikel durch 3-faches Zentrifugieren und Redispergieren in MQ-Wasser gereinigt: Bei 16.100 g wurden die Partikel in einer Eppendorf-Zentrifuge 8 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das NP-Pellet in 1000 µl MQ-Wasser resuspendiert. Um eine vollständige Resuspendierung zu gewährleisten, wurden die Partikel im Ultraschallbad für ca. 3 min behandelt.



## 2.1.5 Variation des ASO

ASO-beladene HSA-NP wurden nach dem Standardprotokoll hergestellt und mit unterschiedlichen ASO-beladen (siehe 2.1.1). Es wurde der Einfluss der Kettenlänge (15mer vs. 20mer), der Modifikation des Rückgrates (ODN vs. PTO) sowie einer endständigen Markierung (Cy5) untersucht.

## 2.2 Einbindung von ASO in kationisierte HSA-Nanopartikel

### 2.2.1 Chemikalien und Geräte

#### Kationisierung des HSA:

|  |                    |  |                       |
|--|--------------------|--|-----------------------|
| Cholamin                                     |                    |  | Merck, Darmstadt      |
| 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid |                    |  | Sigma, Steinheim      |
| MES (BupH™ MES buffered saline pack)         |                    |  | Pierce, Illinois, USA |
| Spectra/Por®CE Dialysiermembran (MWCO 30kDa) |                    |  | Spectrum, Karlsruhe   |
| D-Salt™ Dextran desalting column             |                    |  | Pierce, Illinois, USA |
| Phosphatpuffer pH 7,0:                       | 2,158 g            | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ | Merck, Darmstadt      |
|  | 1,069 g            | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$    | Merck, Darmstadt      |
|  | 8,766 g            | $\text{NaCl}$  | Merck, Darmstadt      |
|  | ad 1,0 L MQ-Wasser |  |                       |

#### Acrylamidgelelektrophorese:

|   |                   |
|---|-------------------|
| Ammoniumperoxodisulfat 10%                        | Serva, Heidelberg |
| 40% Acrylamid, 2% N,N,N',N'-Methylen-bisacrylamid | Roth, Karlsruhe   |
| N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)          | Serva, Heidelberg |

#### Partikelherstellung:

|                                   |                          |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Ethanol reinst                    | Merck, Darmstadt         |
| Glutaraldehyd 25%                 | Merck, Darmstadt         |
| Humanes Serumalbumin (Fraktion V) | Sigma, Steinheim         |
| Natronlauge 1N bzw. 0,1N          | Merck, Darmstadt         |
| 20mer PTO                         | siehe 2.1.1              |
| Salzsäure 1N bzw. 0,1N            | Merck, Darmstadt         |
| Centrifuge 5417 D                 | Eppendorf,<br>Engelsdorf |

---

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| pH-Meter 766 Calimatic                 | Knick, Berlin                        |
| Ultraschallbad Transonic Digital       | Elma, Singen                         |
| Variomag, Multipoint, Magnetrührplatte | H+P Labortechnik,<br>Oberschleißheim |

### 2.2.2 Kationisierung von HSA

Humanes Serumalbumin wurde in Anlehnung an Cui und Mumper mit leichten Abänderungen kationisiert [2002]. Eine Menge von 400 mg Albumin wurde in 4,0 ml MQ-Wasser gelöst, zunächst mit 2160  $\mu$ l einer Cholaminlösung (100 mg/ml), und anschließend mit 4916  $\mu$ l EDC-Lösung (120 mg/ml) versetzt. Das Volumen der Reaktionslösung wurde mit MES-Puffer pH 4,7 auf 15,0 ml ergänzt. Die Konjugationsreaktion wurde bei Raumtemperatur und über Nacht (24 h) durchgeführt. Kationisiertes HSA (cHSA) wurde über eine D-Salt™ Dextran Desalting Säule aufgereinigt und mit PBS pH 7,0 eluiert. Um Nebenprodukte zu beseitigen, wurde das entstandene Albuminkonjugat im Verhältnis 9:1 mit 1N NaOH über Nacht inkubiert. Danach wurde die Lösung gegen MQ-Wasser dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Gefriertrocknung über 72 h mittels Gravimetrie bestimmt. Die Kationisierung des Albumins wurde mit einer Polyacrylamidgel Electrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen überprüft. Das Gel wurde mit Coomassie Blau angefärbt, um die Position des Proteins auf dem Gel sichtbar zu machen.

### 2.2.3 Optimierung der Partikelherstellung

Der Herstellungsprozess von kationisierten HSA-NP (cHSA-NP) wurde durch die Variation verschiedener Parameter optimiert: (1.) pH-Wert der HSA:cHSA-Lösung (pH 5,5; 7,0; 8,0) und (2.) Anteil an cHSA (zwischen 5% und 40%; m:m) zur verbesserten Adsorption und Einbindung des ASO. Ein Volumen von 330,0  $\mu$ l einer 2%igen HSA:cHSA-Lösung (= 6,6 mg) wurden mit einem entsprechendem Volumen an ASO-Lösung (= 100  $\mu$ g ASO) inkubiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurde das Protein durch tropfenweise Zugabe von 900  $\mu$ l Ethanol zu Nanopartikeln desolvatisiert. Zur Stabilisierung der partikulären Struktur wurde direkt im Anschluss an die Desolvatation 1,56  $\mu$ l 8%ige Glutaraldehydlösung zugegeben. Nach 24 h Rühren (500 U min<sup>-1</sup>) wurden die Partikel durch 3-faches Zentrifugieren und Redispergieren in MQ-Wasser gereinigt. Bei 16.100 g wurden die Partikel in einer Eppendorf-Zentrifuge 8 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das NP-

Pellet in 1000 µl MQ-Wasser resuspendiert. Um eine vollständige Resuspendierung zu gewährleisten, wurden die Partikel im Ultraschallbad für ca. 3 min behandelt. Die Partikelcharakterisierung erfolgte durch die Bestimmung der Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, des Zetapotentials, der Partikelausbeute (siehe 2.4) und Beladungseffizienz des ASO (siehe 2.5.4).

## 2.3 Adsorption von ASO an Oberflächen-kationisierte HSA-Nanopartikel

### 2.3.1 Chemikalien und Geräte

#### Partikelherstellung:

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| Ethanol reinst                         | Merck, Darmstadt                     |
| Glutaraldehyd 25%                      | Merck, Darmstadt                     |
| Humanes Serumalbumin (Fraktion V)      | Sigma, Steinheim                     |
| 20mer PTO                              | siehe 2.8.1                          |
| Centrifuge 5417 D                      | Eppendorf,<br>Engelsdorf             |
| pH-Meter 766 Calimatic                 | Knick, Berlin                        |
| Ultraschallbad Transonic Digital       | Elma, Singen                         |
| Variomag, Multipoint, Magnetrührplatte | H+P Labortechnik,<br>Oberschleißheim |

#### Kationisierung der HSA-NP:

|  |                       |
|--|-----------------------|
| Cholamin   | Merck, Darmstadt      |
| 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) | Sigma, Steinheim      |
| MES (BupH™ MES buffered saline pack)               | Pierce, Illinois, USA |

### 2.3.2 Kationisierung der Partikeloberfläche

Zunächst wurden Albumin-Nanopartikel aus 1,0 ml einer 10%igen wässrigen HSA-Lösung durch Desolvatation mit 3 ml Ethanol hergestellt und mit 118 µl einer 8%igen Glutaraldehydlösung vernetzt. Nach der Aufreinigung der Partikel (siehe 2.1.4) wurde die Partikeloberfläche kationisiert. Dazu wurden 75 mg NP mit 870 µl Cholaminlösung (216 mg/ml) und 170 µl EDC-Lösung (66 mg/ml) für 24 h bei RT unter Rühren auf einer Magnetrührplatte inkubiert. Der pH-Wert des

Reaktionsmediums wurde mit MES-Puffer auf pH 4,7 eingestellt. Die NP wurden aufgereinigt und wie unter 2.4 beschrieben charakterisiert.

### 2.3.3 Adsorption von ASO an Oberflächen-kationisierte HSA-NP

Verschiedene Menge an PTO im Bereich zwischen 10 µg und 100 µg wurden an 1 mg Oberflächen-kationisierte HSA-NP (NP+) in 200,0 µl MQ-Wasser für 1 h adsorbiert. Das Ausmaß der Adsorption wurde durch die Messung des Zetapotentials ermittelt. Die Menge an ungebundenem ASO im Überstand der Partikel wurde mittels HPLC nach Zentrifugation detektiert. Um die Stabilität der Adsorption des PTO an die Partikeloberfläche zu zeigen, wurden diese Partikel in serumhaltigen Zellkulturmedium für 1 h bei RT inkubiert. Die Änderung des Zetapotentials, der Partikelgröße und des PTO-Gehaltes im Zellkulturmedium wurde gemessen (siehe 2.4 und 2.5.3).

## 2.4 Charakterisierung der Nanopartikel

### 2.4.1 Chemikalien und Geräte

|                                 |                                      |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| Mikrowaage Sartorius Supermicro | Sartorius, Göttingen                 |
| Spektralphotometer U-3000       | Hitachi, Berkshire, UK               |
| Sterilfilter, 0,22 µm           | Schleicher & Schüll, Dassel          |
| Thermomixer 5436                | Eppendorf, Engelsdorf                |
| Trockenschrank                  | Ehret, Emmendingen                   |
| Vortex Genie 2                  | Scientific Industries, New York, USA |
| Wägeschiffchen                  | Lüdi AG, Flawil, Schweiz             |
| Zetasizer 3000 HSA              | Malvern, Worcestershire, UK          |
| BCA-Protein-Assay-Reagent       | Pierce, Illinois, USA                |

### 2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in den Waschüberständen der Partikel mittels BCA

Der BCA-Assay beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) und der kolorimetrischen Bestimmung des Kupfer-Kations durch Chelatierung mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen [Smith et al., 1985]. Der gebildete Komplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Messung kann im Wellenlängenbereich zwischen 540-590 nm erfolgen.

Je 25,0 µl Probe bzw. 25,0 µl einer entsprechenden Verdünnung wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 800,0 µl frisch hergestelltem BCA-Reagenz versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Lösungen am Photometer vermessen und die Proteinkonzentration anhand einer mitgeführten HSA-Standard-Eichgerade berechnet.

### **2.4.3 Bestimmung der Partikelgröße**

Die Größe der Nanopartikel und deren Größenverteilung wurden nach dem Prinzip der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bestimmt. Die Proben wurden dazu mit filtriertem (Porengröße 0,22 µm) MQ-Wasser verdünnt und in geeigneten Küvetten am Zetasizer 3000 HSA bei 25°C, einem Messwinkel von 90°C und einer Wellenlänge von 633 nm gemessen.

### **2.4.4 Bestimmung des Zetapotentials**

Die Oberflächenladung der NP, genannt Zetapotential, wurde nach dem Prinzip der Mikroelektrophorese am Zetasizer bestimmt. Die NP wurden nach dem Verdünnen der Proben mit filtriertem Wasser oder 1 mM Kaliumchlorid in die M<sup>3</sup>-Elektrophorese Messzelle gegeben und die elektrophoretische Mobilität der suspendierten Teilchen bei 140 Volt gemessen. Daraus wurde dann vom Gerät über die Debye-Hückel-Näherung und die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung das Zetapotential der NP berechnet.

Ebenso wurde auf diese Weise das Zetapotential in Abhängigkeit des pH-Wertes bestimmt. Hierzu wurden die NP mit MQ-Wasser in einem Becher verdünnt, der an der Titrationseinrichtung des Zetasizers montiert war. Über ein vom Zetasizer gesteuertes Hinzutitrieren von Salzsäure 0,1 N bzw. Natronlauge 0,1 N konnte das Zetapotential der NP bei pH-Werten zwischen 3 und 10 kontinuierlich gemessen werden.

### **2.4.5 Bestimmung des Nanopartikelgehaltes**

Der Gehalt der Nanopartikelsuspension wurde gravimetrisch bestimmt. Dazu wurden 50,0 µl der jeweiligen Präparationen in ein tariertes Mikroanalysen-Schiffchen aus Aluminium pipettiert und die Proben bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank bei 80°C getrocknet. Die Schiffchen wurden anschließend auf einer Mikroanalysenwaage gewogen und die Ausbeute an Festsubstanz als Gehalt in mg / ml ermittelt.

## 2.5 Bestimmung des ASO-Gehaltes in Partikeln

### 2.5.1 Chemikalien und Geräte

#### HPLC-Analytik:

|                                    |                          |
|------------------------------------|--------------------------|
| Autosampler AS-200A                | Merck-Hitachi, Darmstadt |
| Dioden-Array-Detektor (DAD) L-4500 | Merck-Hitachi, Darmstadt |
| HPLC-Gradienten-Pumpe L-6220       | Merck-Hitachi, Darmstadt |
| HPLC-Mikroeinsätze                 | Merck, Darmstadt         |
| HPLC-Säule: DNAPac® PA 100 4 x 250 | Dionex, Idstein          |
| Interface D-6000A                  | Merck-Hitachi, Darmstadt |

#### Fließmittel:

|  |                  |
|--|------------------|
| Dinatriumhydrogenphosphat x Monohydrat | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid                         | Merck, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat x Dihydrat   | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid 2 N                    | Merck, Darmstadt |
| Natriumperchlorat                      | Merck, Darmstadt |

#### Partikelabbau:

|                  |                             |
|------------------|-----------------------------|
| Proteinase K     | Merck, Darmstadt            |
| Trypsin 10x      | Gibco/Invitrogen, Karlsruhe |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf, Engelsdorf       |

#### Puffer:

|                        |                    |   |                  |
|------------------------|--------------------|---|------------------|
| Phosphatpuffer pH 7,5: | 16,8 g             | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | Merck, Darmstadt |
|                        | 2,3 g              | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   | Merck, Darmstadt |
|                        | 0,37 g             | NaEDTA  | Merck, Darmstadt |
|                        | ad 1,0 L MQ-Wasser |   |                  |
| TRIS HCl pH 8,5:       | 1,515 g            | TRIS  | Merck, Darmstadt |
|                        | 2,192 g            | NaCl  | Merck, Darmstadt |
|                        | 0,093 g            | NaEDTA  | Merck, Darmstadt |
|                        | ad 50 ml MQ-Wasser |   |                  |

---

## 2.5.2 HPLC-Methode

Zur HPLC-analytischen Bestimmung der Oligonukleotide wurden jeweils 100 µl der Oligonukleotidlösungen mit einer Konzentration zwischen 0 und 50 µg/ml Oligonukleotid in einen Mikroeinsatz pipettiert. Durch Einsatz zweier Fließmittel mit unterschiedlichem Salzgehalt wurde ein Fließmittelgradient generiert. Es wurde ein Volumen von 20,0 µl eingespritzt, der Fließmittelfluss wurde auf 1,0 ml/min eingestellt und die Detektion erfolgte unter Verwendung eines Dioden-Array-Detektors bei 260 nm. Die Konzentration der Proben wurde durch die Auswertung der Peakflächen ermittelt und anhand einer Eichgeraden berechnet. Für die Analytik von unmodifizierten Oligonukleotiden (ODN) und modifizierten Oligonukleotiden (PTO) wurden unterschiedliche Fließmittel gewählt.

### 2.5.2.1 Methode A: Quantifizierung von ODN

Fließmittel A: MQ-Wasser  
Fließmittel B: 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0  
Fließmittel C: 1 M Natriumchlorid

#### Fließmittelgradient:

Der ODN-Gehalt wurde mit einem Gradienten aus einer Mischung der obengenannten 3 Fließmittel bestimmt. Es wurde ein linearer Gradient verwendet, der von 0 auf 250 mM Natriumchlorid innerhalb von 14 min anstieg. Der pH-Wert des Eluentensystems wurde mittels 10 mM Natriumphosphatpuffer konstant bei pH 7,0 gehalten.

### 2.5.2.2 Methode B: Quantifizierung von PTO

Fließmittel A: MQ-Wasser  
Fließmittel B: 250 mM Natriumhydroxid  
Fließmittel C: 1 M Natriumperchlorat

#### Fließmittelgradient:

Für die Konzentrationsbestimmung von modifizierten Oligonukleotiden stieg durch einen linearen Gradienten die Natriumperchlorat-Konzentration von 0 auf 450 mM innerhalb von 14 min. Der pH-Wert des Eluentensystems wurde mit 25 mM Natriumhydroxid konstant im stark Alkalischen gehalten.

### **2.5.3 Indirekte Bestimmung über Waschüberstände der Partikel**

Die Menge an ASO gebunden an HSA-Nanopartikel wurde berechnet anhand der Differenz zwischen Gesamtmenge an eingesetztem ASO und der Menge an ASO in den Waschüberständen der Partikel, die während der Partikelaufreinigung erhalten wurden. Die ASO-Beladungseffizienz wurde berechnet als die Menge an ASO in der Partikelmatrix relativ zur eingesetzten Initialmenge an ASO.

### **2.5.4 Direkte Bestimmung mittels Partikelabbau**

Zur direkten Bestimmung des ASO-Gehaltes der Nanopartikel wurde die Beladung der Partikel nach enzymatischen Abbau der Partikelmatrix detektiert.

#### **2.5.4.1 Etablierung einer Methode zum Partikelabbau**

Für die Untersuchung des enzymatischen Abbaus der Nanopartikel wurden Partikel wie folgt hergestellt: 3,0 ml Ethanol wurden tropfenweise unter ständigem Rühren zu 1,0 ml einer 2%igen wässrigen HSA-Lösung hinzugegeben und die erhaltenen Nanopartikel mit verschiedenen Mengen an Glutaraldehydlösung 8% quervernetzt (4,7 µl; 5,9 µl; 7,0 µl; 8,2 µl; 9,4 µl; 10,6 µl).

Eine Menge von 1,0 mg der HSA-Nanopartikel wurden in einer 50 µg/ml Trypsinlösung (PBS pH 7,5) oder in 1,0 ml einer 2 µg/ml Proteinase K-Lösung (TRIS pH 8,5) redispergiert. Die Proben wurden bei 37°C unter permanentem Schütteln bei 600 U min<sup>-1</sup> im Thermomixer inkubiert.

Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 50,0 µl der jeweiligen Proben entnommen und mit 950,0 µl entsprechendem Puffer verdünnt. Die verbleibende Trübung der Proben wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt.

Der Nanopartikelgehalt der Proben wurde relativ zu Referenzproben berechnet. Die Referenzproben wurden unter gleichen Bedingungen mit Ausnahme des Enzymzusatzes inkubiert und beinhalteten verschiedene Mengen an HSA-NP.



## 2.6 Zellkulturen

### 2.6.1 Chemikalien und Geräte

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Brutschränke   | Heraeus, Hanau                 |
| Laminar-Flow-Sterilwerkbänke                         | Holten, Nunc                   |
| Chamber Slide Flask                                  | Nunc, Wiesbaden                |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)           | Eppendorf, Hamburg             |
| Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 µl)          | Costa                          |
| Plastikröhrchen Falcon® (15 und 50 ml)               | Becton Dickinson, Heidelberg   |
| Sterile Einmalpipetten (5, 10 und 25 ml)             | Greiner, Frickenhausen         |
| Sterilfilter 0,2 µm                                  | Schleicher & Schüll, Millipore |
| Zählkammer   | Assistent, Sondheim            |
| Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm <sup>2</sup> ) | Nunc, Wiesbaden                |
| 6-, 12- und 24-Well-Platten                          | Nunc, Wiesbaden                |
| 96-Well-Mikrotiterplatten                            | Nunc, Wiesbaden                |

#### Reagenzien für die Zellkultur:

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| DMSO                                      | Sigma, Steinheim            |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | Sigma, Steinheim            |
| DMEM nutrient mixture F-12 Ham            | Sigma, Steinheim            |
| Fötales Kälberserum (FCS)                 | PAA Laboratories, Cölbe     |
| L-Glutamin (200 mM)                       | Gibco/Invitrogen, Karlsruhe |
| Leibovitz's L-15 Medium                   | Sigma, Steinheim            |
| McCoy's 5a Medium                         | Sigma, Steinheim            |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 µg/ml)    | Gibco/Invitrogen, Karlsruhe |
| 1x PBS, Dulbecco's                        | PAA Laboratories, Cölbe     |
| RPMI 1640 Medium                          | Gibco/Invitrogen, Karlsruhe |
| Trypanblau-Lösung                         | Sigma-Aldrich, Steinheim    |
| Trypsin/EDTA                              | Gibco/Invitrogen, Karlsruhe |

### Zellaufnahmestudien:

|                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| Partikelherstellung     | siehe 2.1.4                 |
| 20mer Cy5-PTO           | siehe 2.1.1                 |
| Alexa594 Concanavalin A | Molecular Probes, Göttingen |
| Vectashield™            | Vector, Burlingame, USA     |
| Paraformaldehyd         | Sigma-Aldrich, Steinheim    |

### CLSM:

|                                 |                           |
|---------------------------------|---------------------------|
| Mikroskop Leitz DMI RB          | Leica, Wetzlar            |
| True confocal Scanner TCS 4D    | Leica, Wetzlar            |
| Imaris Bildbearbeitungssoftware | Bitplane, Zürich, Schweiz |
| Selima-Bilddaten-Software       | Bitplane, Zürich, Schweiz |

### FACS:

|                        |             |                              |                  |
|------------------------|-------------|------------------------------|------------------|
| Partikelherstellung    |             | siehe 2.1.4                  |                  |
| FACScan Flow Cytometer |             | Becton Dickinson, Heidelberg |                  |
| CellQuest Software     |             | BD-Biosciences, Heidelberg   |                  |
| FACS Puffer            | BSA         | 3,0 g                        | Sigma, Steinheim |
|                        | Natriumazid | 0,5 g                        | Merck, Darmstadt |
|                        | PBS         | ad 500 ml                    | PAA, Cölbe       |

## 2.6.2 Krebszell-Linien

|            |                    |
|------------|--------------------|
| A549       | CLS, Heidelberg    |
| BT474      | DSMZ, Braunschweig |
| MCF7       | DSMZ, Braunschweig |
| MDA-MB-435 | CLS, Heidelberg    |
| MDA-MB-468 | ATCC, Manassas     |
| SK-Br-3    | ATCC, Manassas     |

### 2.6.2.1 Charakteristika der Krebszell-Linien

Die **A549-Zell-Linie** wurde 1972 aus Lungenkarzinomgewebe eines 58 Jahre alten kaukasischen Mannes gewonnen [Giard et al., 1973].

Die **BT474-Zell-Linie** ist eine humane Adenokarzinom-Zell-Linie mit einer Überexpression des HER2 Oberflächenprotein [Lasfargues et al., 1978].

Die **MCF7-Zell-Linie** besitzt Eigenschaften von differenzierten Mammaepithelzellen, einschließlich der Fähigkeit durch Estradiol über den zytoplasmatischen Rezeptor das Wachstum der Zelle zu fördern [Brooks et al., 1973].

Die **MDA-MB-435-** ebenso wie die **MDA-MB-468-Zell-Linie** wurden aus Thoraxgewebe einer 31 Jahre alten Frau bzw. einer 51 Jahre alten schwarzen Patientin mit metastasierendem Brustadenokarzinom isoliert [Cailleau et al., 1978].

Die **SK-Br-3-Zell-Linie** ist eine Mammakarzinom-Zell-Linie und überexprimiert das HER2-Protein [Trempe, 1976].

#### 2.6.2.2 Kultivierung der Krebszell-Linien

Die Kultivierung der adhärenenten Zell-Linien A549, BT474, MCF7, MDA-MB-435, MDA-MB-468 und SK-Br-3 erfolgte in 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen. MCF7-Zellen wurden in RPMI Medium, SK-Br-3-Zellen in McCoy's 5a Medium, A549-Zellen in DMEM Medium, MDA-MB-435-Zellen in DMEM F12 Ham Medium und BT474-Zellen in RPMI Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert. Die entsprechenden Medien wurden mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin supplementiert. Im Fall der BT474-Zellen beinhaltete das Medium Insulin (10 µg/ml) und 20% FCS.

MDA-MB-468-Zellen wurden in Leibovitz's L-15 Medium, das mit 10% FCS, 2% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin supplementiert war, in einem Brutschrank mit kontrollierter Luftfeuchte in Abwesenheit von CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert.

Zum Weiterziehen der Zellen wurden sie regelmäßig mit Trypsin alle 3 Tage gesplittet. Zum Ausplattieren in Well-Platten wurden sie trypsinisiert, in Zählkammern gezählt und anschließend in frischem Medium in der gewünschten Zellzahl in die Wells der Platten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht adhärenieren gelassen und am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit den verschiedenen Nanopartikelzubereitungen.

#### 2.6.3 Zytotoxizitäts-Test

Die beiden Brustkrebszell-Linien SK-Br-3 und MDA-MB-468 wurden in einer Ausgangskonzentration von 50.000 Zellen/Well in 24-Well-Platten ausplattiert. Nach 24 h waren die Zellen adhärenent und das Medium wurde mit verschiedenen Nanopartikelzubereitungen, die auf die gewünschte Partikelkonzentration mit Medium verdünnt wurden, ausgetauscht. Nanopartikelkonzentrationen von 0,1 mg/ml, 1,0 mg/ml und 5,0 mg/ml wurden über einen Zeitraum von 144 h getestet.

Die Zellproliferation wurde anhand der Zellzahl nach Ablösen der Zellen mit Trypsin und Trypanblaufärbung bestimmt.

#### **2.6.4 Partikelstabilität in Zellkulturmedium**

Für die Untersuchung der Partikelstabilität in Zellkulturmedium wurden HSA-Nanopartikel durch Desolvatation von 330,0 µl einer 2%igen HSA-Lösung (= 6.6 mg HSA) mit 900 µl Ethanol hergestellt. Die Partikel wurden mit 1,55 µl oder 7,75 µl einer 8%igen Glutaraldehydlösung quervernetzt und wie unter 2.1.4 beschrieben aufgereinigt.

Die Partikelzubereitungen wurden in Konzentrationen von 1,0 mg/ml und 5,0 mg/ml in den entsprechenden Zellkulturmedien für 1, 4, 6, 24 und 48 h bei 37°C unter permanentem Schütteln inkubiert. Der Einfluss des Zellkulturmediums auf die Partikelstabilität wurde anhand der Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilung so wie einer Trübungsmessung (siehe 2.5.4.1) analysiert.

#### **2.6.5 Zellaufnahmestudien der NP mittels CLSM**

##### **2.6.5.1 Partikelherstellung**

Zellaufnahmestudien wurden mit Nanopartikel durchgeführt, die aus 1,0 ml einer 2%igen wässrigen HSA-Lösung durch Desolvatation mit 2,7 ml Ethanol hergestellt und mit 23,5 µl einer 8%igen Glutaraldehydlösung vernetzt wurden.

##### **2.6.5.2 Konfokales Laserscanning Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)**

Zur Dokumentation der Aufnahme der NP in Zellen wurden die Proben unter dem CLSM betrachtet. Beim CLSM wird das zu mikroskopierende Objekt nicht im Ganzen ausgeleuchtet, sondern Punkt für Punkt mit einem Argon-Krypton-Laser abgerastert. Durch diese Untersuchung wird eine dreidimensionale Darstellung der Zelle ermöglicht, indem Aufnahmen von 42 Ebenen in einem Abstand von ungefähr 600 nm einer fluoreszenzmarkierten Zelle gemacht werden. Der Ar-Kr-Laser verfügt über drei diskrete Laserlinien verschiedener Wellenlängen ( $\lambda = 488, 568, 647 \text{ nm}$ ) und kann damit sowohl FITC (Fluoresceinisothiocyanat)- als auch TRITC (Tetramethylisothiocyanat)-Farbstoffe zur Fluoreszenz anregen. Durch optische Filter kann der jeweils unerwünschte Anteil des emittierten Fluoreszenzlichtes ausgeblendet werden. So ist es möglich, mit einer 2-Kanal-Aufnahmetechnik die von

Zellmembran und Nanopartikel ausgehenden Fluoreszenzen getrennt aufzunehmen und die generierten Bilder beider Kanäle anschließend übereinander zu legen. Daraus kann ein dreidimensionales Bild der Zelle errechnet und die Aufnahme der Nanopartikel in der Zelle aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz verfolgt werden.

Zelluläre Proteoglycane, Glycoproteine und Glycolipide enthalten eine große Anzahl an verschiedenen Oligosacchariden. Sie befinden sich zahlreich an Zelloberflächen, sind aber auch im Zellinneren zu finden. Lektine, die spezifisch an diese Strukturen binden, können somit zum Nachweis herangezogen werden. In diesem Fall wurde mit einem fluoreszierenden Konjugat des Lektins Concanavalin A gearbeitet. Concanavalin A bindet selektiv an  $\alpha$ -Mannopyranosyl und  $\alpha$ -Glycopyranosyl-Reste auf der Zelloberfläche und kann so das Fluorophor mit den Zellen verbinden.

Um die Färbung der Zellmembran von den autofluoreszierenden NP zu unterscheiden, sollten die Fluoreszenzwellenlängen der beiden Label möglichst weit auseinander liegen. Der Hauptanteil der Autofluoreszenz von HSA-NP liegt im FITC-Bereich, während die Färbung der Zellmembran in den Experimenten mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff (Alexa594 ConA) durchgeführt wurde. Das hier verwendete Fluorophor besitzt eine höhere Photostabilität. Ein Ausbleichen der Proben ist dadurch erst viel später als bei einer direkten FITC-Markierung zu erwarten. Es absorbiert bei einer Wellenlänge von 590 nm und emittiert bei einer Wellenlänge von 617 nm.

#### **2.6.5.3 Inkubation und Fluoreszenzmarkieren der Zellmembran**

Zellen wurden in einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Slide Flask ausplattiert und über Nacht adhären gelassen.

Zum Nachweis der Partikelaufnahme wurden die Zellen mit einer entsprechenden Menge an NP (1 mg/ml Medium) für 1 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Eine Färbung der Membran wurde durch Inkubieren mit 500  $\mu$ l Alexa-594 Concanavalin A 0,0005% über 2 min erreicht. Zur Fixierung der Zellen wurden sie mit 500  $\mu$ l Paraformaldehyd-Lösung (4% in PBS) für 30 min behandelt. Daraufhin wurde zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Um ein dauerhaftes Präparat zu erhalten, wurden die Zellen in Vectashield™-Lösung eingebettet. Die Präparate wurden bis zur CLSM-Untersuchung bei 4°C unter Lichtausschluss aufbewahrt.

## **2.6.6 Untersuchung der intrazellulären Freisetzung von Cy5-ASO aus HSA-NP mittels CLSM**

Für die Experimente der intrazellulären Verteilungen eines Cy5-gelabelten ASO wurden Nanopartikel mit 100 µg Cy5-PTO-beladen. Ein Volumen von 330,0 µl einer 2%igen HSA-Lösung (= 6,6 mg HSA pH 7,0) wurde mit 100 µg Cy5-PTO für 30min bei RT inkubiert, mit 900 µl Ethanol desolvatisiert und die erhaltenen Partikel mit 1,55 µl einer 8%igen wässrigen Glutaraldehydlösung stabilisiert. Die Nanopartikel wurden wie unter 2.1.4 beschrieben aufgereinigt.

Die intrazelluläre Freisetzung von Cy5-PTO aus HSA-NP wurde wie unter 2.6.5.3 untersucht. Das Cy5-markierte PTO absorbiert im CLSM bei einer Wellenlänge von 643 nm und emittiert bei einer Wellenlänge von 667 nm.

## **2.6.7 Quantifizierung der Partikelaufnahme mittels FACS-Analyse**

### **2.6.7.1 Partikelherstellung**

Zellaufnahmestudien wurden mit Nanopartikeln durchgeführt, die aus 1,0 ml einer 2%igen wässrigen HSA-Lösung durch Desolvatation mit 2,7 ml Ethanol hergestellt und mit 23,5 µl einer 8%igen Glutaraldehydlösung vernetzt wurden.

### **2.6.7.2 Inkubationsbedingungen und FACS-Analyse**

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von < 70% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Nanopartikelproben in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 und 1000 µg/ml in Zellkulturmedium bei 37°C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert, zentrifugiert und in FACS-Puffer resuspendiert.

Alle Daten wurden mit einem FACScan Flow Cytometer aufgenommen. Die Akquisitionsparameter wurden für die Detektion der Nanopartikel im FITC Bereich (Absorption bei 488 nm mit einem Argonlaser und Detektion bei 505 nm) optimiert. Eine Anzahl von 10.000 Zellen wurden je Messung/Zellprobe ausgezählt. Alle Messungen wurden mit der CellQuest Software ausgewertet. Die Analysen der Daten wurden mit der gleichen Software unter Anwendung des Multiparameter Gating fertiggestellt.

## 2.7 Antikörper-vermittelte zelluläre Partikel Aufnahme

### 2.7.1 Chemikalien und Geräte

#### Biotinylierung des AK:

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Avidin  | MoBiTec, Göttingen                  |
| Biotin  | Fluka, Neu-Ulm                      |
| D-Salt™ Dextran Desalting column                | Pierce, Illinois, USA               |
| DMSO  | Merck, Darmstadt                    |
| 4-Hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid<br>(HABA) | Sigma, Steinheim                    |
| MicroBC Assay Protein Quantitation Kit          | Uptima-Interchim, Montlucon, France |
| N-Hydroxysuccinimidobiotin (NHS-Biotin)         | Pierce, Illinois, USA               |
| Trastuzumab (Herceptin®)                        | Roche Diagnostic, Mannheim          |

#### Puffer:

|             |                    |                |                  |
|-------------|--------------------|----------------|------------------|
| PBS pH 7,0: | siehe 2.2.1        |                |                  |
| TEA pH 8,0  | 7,46 g             | Triethanolamin | Merck, Darmstadt |
|             | 0,372 g            | NaEDTA         | Merck, Darmstadt |
|             | ad 1,0 L MQ-Wasser |                |                  |
| TRIS pH 8,5 | siehe 2.5.1        |                |                  |

#### NP-Herstellung:

|  |                         |
|--|-------------------------|
| Geräte   | siehe 2.1.1             |
| Gelatine Typ A (porcine skin, 175 bloom)   | Sigma, Steinheim        |
| Aceton   | Merck, Darmstadt        |
| Humanes Serumalbumin (Fraktion V)  | Sigma, Steinheim        |
| Poly(ethylene glycol)- $\alpha$ -maleimide- $\omega$ -NHS<br>Ester (NHS-PEG3400-Mal) | Nektar, Huntsville, USA |
| mPEG-SPA-5000  | Nektar, Huntsville, USA |
| NeutrAvidin™   | Pierce, Rockford, USA   |
| 2-Iminothiolane (Trauts Reagenz)   | Pierce, Rockford, USA   |
| 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)<br>(Ellmans Reagenz)                            | Pierce, Illinois, USA   |

## Material und Methoden

---

|   |                       |
|---|-----------------------|
| m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-sulfosuccinimide (sulfo-MBS) | Pierce, Illinois, USA |
| D-Salt™ Dextran Desalting column                          | Pierce, Illinois, USA |

### Western Blot:

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| Zellen   | siehe 2.6.2                      |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                           | Merck, Darmstadt                 |
| BioRad Protein Assay                                 | Bio-Rad, Richmond, CA            |
| Nitrocellulosemembran, Hybond-C Extra                | Amersham, Arlington, Heights, IL |
| x-Ray Film   | Kodak, Rochester, NY             |
| Scanner  | Snapscan1236, Agfa, Köln         |
| Gelscan 5.02 Software                                | BioSciTec, Frankfurt             |
| Antikörper (AK)                                      |                                  |
| - HER2, monoklonaler Maus AK                         | Oncogene, Boston, USA            |
| - Aktin, monoklonaler Maus AK                        | Sigma, St. Louis, USA            |
| - Sekundär-AK, goat anti mouse                       | Santa Cruz, Heidelberg           |
| ECL-Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrat | Pierce, Illinois, USA            |

### Lysepuffer:

|              |            |                      |                  |
|--------------|------------|----------------------|------------------|
| RIPA-Puffer: | 150 mM     | NaCl                 | Merck, Darmstadt |
|              | 50 nM      | TRIS pH 8,0          | Merck, Darmstadt |
|              | 1 mM       | EDTA                 | Merck, Darmstadt |
|              | 0,5% (w/v) | Natriumdesoxycholat  | Merck, Darmstadt |
|              | 0,1% (w/v) | Nonidet P-40         | Sigma, Steinheim |
|              | 1,0% (w/v) | Natriumdodecylsulfat | Merck, Darmstadt |

### Zellkultur:

siehe 2.6.2

### FACS:

siehe 2.6.7.2

### CLSM:

siehe 2.6.5.2



## 2.7.2 Biotinylierung von Trastuzumab

Um die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors spezifisch zu erkennen, wurde der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab verwendet. Um eine Verknüpfung des AK mit NeutrAvidin™-modifizierten Nanopartikeln zu ermöglichen, wurde Trastuzumab in Anlehnung an ein Standardproteinmodifikationsprotokoll biotinyliert (Sigma-Aldrich, Steinheim). Zunächst wurde Trastuzumab in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS Puffer pH 7,0 hergestellt. Das molare Verhältnis während der Biotinylierungsreaktion betrug 5:1 des Biotinylierungsreagenz (NHS-Biotin 1 mg/ml in DMSO) zu Trastuzumab (ca. MW = 150.000 Da). Die Reaktion erfolgte bei RT unter ständigem Rühren für 30 min. Anschließend wurde der modifizierte AK über eine D-Salt™ Dextran Desalting Säule aufgereinigt. Die AK enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und die Proteinkonzentration mit einem MicroBC-Assay bestimmt. Das Biotin/AK-Verhältnis wurde mit dem kolorimetrischen HABA-Assay bestimmt und anhand des Herstellerprotokolls mit leichten Abweichungen durchgeführt (gemessene Konzentration 1 bis 2 Biotinmoleküle pro AK). Zu 50,0 µl der Leerprobe (PBS pH 7,0), 50,0 µl der Analysenprobe und 50,0 µl eines Standards (14,6 µM Biotin in PBS pH 7,0) wurden 50,0 µl HABA/Avidin-Lösung (300 µM HABA und 7,5 µM Avidin in PBS pH 7,0) hinzugefügt und sofort bei 500 nm photometrisch vermessen. Diese kolorimetrische Methode basiert auf dem Austausch des von Avidin gebundenen HABA gegen Biotin. Durch die Abnahme der Absorption bei Verdrängen des Avidin gebundenen HABAs kann die Biotinkonzentration in der Analysenprobe berechnet werden (HABA/Avidin Extinktionskoeffizient  $E_{500} = 34,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

## 2.7.3 Herstellung AK-modifizierter Partikelsysteme

Für die FACS-Analysen wurden Nanopartikel eingesetzt, die den anti-HER2 AK über das NeutrAvidin/Biotin-System gebunden hatten. Die Herstellung wurde vereinfacht. In den Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung eines Cy5-markierten PTO aus anti-HER2-HSA-NP mittels CLSM wurden Nanopartikel verwendet, die den thiolierten AK direkt an die sulfhydrylaktiven Gruppen der Nanopartikel gebunden hatten.

### 2.7.3.1 Herstellung von Gelatine-Nanopartikeln

Gelatine-Nanopartikel wurden nach zweifach Desolvationsmethode hergestellt [Coester et al., 2000]. Eine Menge von 500 mg Gelatine wurde in 10 ml MQ-Wasser

bei 50°C im Wasserbad gelöst und 10 ml Aceton wurde hinzugegeben. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in 10 ml MQ-Wasser wieder gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 2,5 eingestellt, 30 ml Aceton wurden hinzugefügt und die Nanopartikel wurden mit 500 µl einer 8%igen wässrigen Glutaraldehyd über Nacht chemisch quervernetzt. Die Nanopartikel wurden durch mehrfaches Zentrifugieren und Redispergieren in MQ-Wasser aufgereinigt (siehe 2.1.4).

Für die Thiolierung der Nanopartikeloberfläche wurden 30 mg 2-Iminothiolan in 2,5 ml TRIS Puffer pH 8,5 zu 1,0 ml Nanopartikelsuspension (20 mg/ml) hinzugefügt. Die Probenmischung wurde über Nacht inkubiert und die Partikel anschließend aufgereinigt. Die eingeführten Sulfhydrylgruppen wurden mit 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) photometrisch bestimmt [Weber et al., 2000b]. FITC-konjugiertes NeutrAvidin™ (NAv-FITC, 2,5 mg) wurde in 500 µl PBS Puffer pH 7,0 gelöst und mit einer sulfo-MBS-Lösung (0,75 mg in 50 µl PBS) versetzt. Nach 1 h bei 20°C wurde das sulfo-MBS aktivierte NAv-FITC über eine D-Salt™ Säule aufgereinigt. Ein Anteil der Proteinlösung wurde zu einem gleichen Volumen an thiolierten Nanopartikeln hinzugesetzt. Die Probenmischung wurde unter permanentem Schütteln im Thermomixer für 12 h bei RT stehen gelassen. Das ungebundene Avidinderivat wurde durch wiederholtes Zentrifugieren und Redispergieren abgetrennt. Die gesammelten Überstände wurden photometrisch bei 280 nm vermessen und auf ungebundenen Anteil an NAv-FITC analysiert.

Zu 550 µl (18 mg/ml) NAv-FITC modifizierten Nanopartikeln wurden mit 140 µl biotinylierten anti-HER2 AK (50 µg) für 90 min bei 10°C inkubiert. Danach wurden die Nanopartikel durch mehrfaches Zentrifugieren und Redispergieren aufgereinigt. Die gesammelten Überstände wurden auf ungebundene AK durch Immunoblotting analysiert [Wartlick et al., 2004a].

Kontrollexperimente wurden mit unmodifizierten NP anstelle von anti-HER2-NP durchgeführt. Dazu wurde NeutrAvidin™ kovalent an die Nanopartikeloberfläche gekoppelt, jedoch wurde kein biotinylierter AK zugesetzt.

### **2.7.3.2 Indirekte Konjugation des Antiköpers an Albumin-Nanopartikel**

Albumin-Nanopartikel wurden nach der Desolvatationsmethode, beschrieben bei Weber et al. [2000a], hergestellt. Nach der Aufreinigung wurden die Nanopartikel mit einem heterobifunktionalen Crosslinker Poly(ethylene glycol)- $\alpha$ -maleimide- $\omega$ -NHS Ester mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 3,4 kDa (NHS-PEG3400-Mal) aktiviert, um eine Reaktivität für Sulfhydrylgruppen (Maleinimidgruppen) auf der

Partikeloberfläche einzuführen. Zu 2,0 ml Nanopartikeldispersion (pH 8,0) wurden 500 µl Crosslinker-Lösung (20 mg in PBS Puffer pH 8,0) hinzugegeben. Die Probenmischung wurde unter permanentem Schütteln im Thermomixer für 1 h bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die Partikel aufgereinigt.

Für die nachfolgende Konjugation mit NeutrAvidin™ (NAv) an die sulfhydrylreaktiven Nanopartikel mit dem heterobifunktionalen Crosslinker wurden im ersten Schritt freie Sulfhydrylgruppen in das NAv-Molekül eingeführt. Für die Thiolierungsreaktion wurden 10,0 mg NAv in 1,0 ml TEA-Puffer pH 8,0 und 0,2 mg 2-Iminoethanol (Trauts Reagenz) in 1,0 ml TEA-Puffer pH 8,0 hinzugegeben und für 12 h bei RT inkubiert. Das thiolierte Protein wurde über eine Größenausschlusschromatographie (D-Salt™ Säule) aufgereinigt. Die Bestimmung der Anzahl an eingeführten Sulfhydrylgruppen in das NAv-Molekül wurden mit dem Ellmans Reagenz (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) bestimmt [Weber et al., 2000b].

Für die Konjugationsreaktion zwischen thioliertem NAv und sulfhydrylreaktiven Nanopartikeln wurde 1 ml thiolierter NAv-Lösung zu 1 ml sulfhydrylreaktive HSA-Nanopartikel hinzugesetzt und für 12 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Das nicht abreagierte thiolierte NAv wurde durch Zentrifugieren und Redispergieren der Partikel in MQ-Wasser abgetrennt. Die Überstände der Aufreinigungsschritte wurden photometrisch bei 280 nm auf ungekoppeltes NAv analysiert.

Für die Herstellung von anti-HER2-NP wurden ungefähr 400 µl der aufgereinigten NAv-modifizierten HSA-NP (10 mg) mit 140 µl biotinylierten anti-HER2 AK (50 µg) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 12 h wurden die Nanopartikelüberstände auf ungebundenen AK durch Immunoblotting gescreent [Wartlick et al., 2004a].

### **2.7.3.3 Direkte Konjugation des Antikörpers an Albumin-Nanopartikel**

Albumin-Nanopartikel wurden nach der Desolvationsmethode, beschrieben unter 2.1.4, hergestellt. Zu 0,5 ml Nanopartikeldispersion (in PBS pH 8,0) wurden 100 µl Crosslinker-Lösung (Poly(ethylene glycol)- $\alpha$ -maleimide- $\omega$ -NHS Ester) oder PEG-Lösung (mPEG-SPA-5000) (60 mg/ml in PBS Puffer pH 8,0) hinzugegeben. Die Probenmischung wurde unter permanentem Schütteln im Thermomixer für 1 h bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die Partikel aufgereinigt.

Für die Thiolierungsreaktion wurden 900 µg Trastuzumab in 1,0 ml TEA-Puffer pH 8,0 und 42 µg 2-Iminoethanol (Trauts Reagenz) in 36,7 µl TEA-Puffer pH 8,0 hinzugegeben und für 12 h bei RT inkubiert. Das thiolierte Protein wurde über eine Größenausschlusschromatographie (D-Salt™ Säule) aufgereinigt.

Für die Konjugationsreaktion zwischen thiolisiertem Trastuzumab und sulfhydrylreaktiven Nanopartikeln wurde 500 µl thiolierter Trastuzumab-Lösung zu 500 µl sulfhydrylreaktiven HSA-Nanopartikeln hinzugesetzt und für 12 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Das nicht abreagierte thiolierte Trastuzumab wurde durch Zentrifugieren und Redispergieren der Partikel in MQ-Wasser abgetrennt. Die Überstände der Aufreinigungsschritte wurde mittels BCA-Assay (2.4.2) auf ungekoppeltes Trastuzumab analysiert.

### **2.7.4 HER2-Proteinnachweis mittels Western Blot**

Die Expressionslevel der BT474, MCF7, MDA-MB-435 und SK-Br-3-Zellen wurden mittels Western Blot ermittelt. Alle Zellen wurden in T75-Kulturflaschen ausplattiert. Nachdem die Zellen eine Konfluenz > 70% erreicht hatten, wurden sie mit eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen sofort mit einem Lysepuffer versetzt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit einem Bio-Rad Protein Assay bestimmt. Die Proteinextrakte der jeweiligen Zellen mit gleichen Proteinkonzentrationen (30 µg) wurden auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und nachfolgend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wurde mit 5%igen Milchpuffer über Nacht abgesättigt und danach für je 1 h bei RT mit Antikörper (HER2-AK, Aktin-AK, Sekundär-AK) inkubiert. Die Antikörpersignale wurden mit der ECL-Methode (enhanced chemiluminescence) gemessen. Die Membran wurde einem Film ausgesetzt. Der Film wurden entsprechend der Anweisungen des Herstellers entwickelt.

Für eine quantitative Bestimmung der HER2-Proteinexpression wurde der Film mit einem Scanner eingescannt. Die Bandenintensitäten wurden mit einer Gelscan 5.02 Software ausgewertet. Die Aktinbanden dienten zur Standardisierung der aufgetragenen Proteinbanden.

### **2.7.5 Quantifizierung der zellulären NP-Bindung mittels FACS**

Alle Daten wurden mit einem FACScan Flow Cytometer aufgenommen. Die Akquisitionsparameter wurden für die Detektion der Nanopartikel im FITC Bereich (Absorption bei 488 nm mit einem Argonlaser und Detektion bei 505 nm) optimiert. Eine Anzahl von 10.000 Zellen wurden je Messung/Zelltyp ausgezählt. Alle Messungen wurden mit der CellQuest Software ausgewertet. Die Analysen der Daten wurden mit der gleichen Software unter Anwendung des Multiparameter Gating fertiggestellt.

### **2.7.5.1 Zellspezifische Bindung von anti-HER2-Nanopartikeln**

Um die Spezifität der Bindung von anti-HER2-Nanopartikeln an Tumorzellen zu untersuchen, wurde die zelluläre Bindung der NP in verschiedenen Tumorzell-Linien mit unterschiedlichen HER2-Expressionsleveln bestimmt. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von < 70% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Nanopartikelproben (100 µg/ml Zellkulturmedium) bei 37°C für 3 h inkubiert (n = 4). Darüber hinaus, um die Spezifität der Partikelbindung an HER2-überexprimierenden Zellen zu belegen, wurden mit der SK-Br-3-Zell-Linie Experimente mit und ohne Vorinkubation von freiem Trastuzumab in einer Konzentration von 2,5 µg/ml für 30 min durchgeführt.

Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert, zentrifugiert und in FACS-Puffer (3% bovines Serumalbumin und 0,5% Natriumazid in PBS) resuspendiert. Die FACS-Analysen wurden wie unter 2.7.5 beschrieben ausgeführt.

### **2.7.5.2 Zeitabhängigkeit der Partikelbindung**

Die Kinetik der zellulären Partikelbindung an SK-Br-3 Tumorzellen, die das HER2-Protein überexprimieren, wurde nach 30, 60 und 180 min untersucht. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von < 70% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Nanopartikelproben (100 µg/ml Zellkulturmedium) bei 37°C inkubiert (n = 4). Zusätzlich wurden Versuche mit Trastuzumabvorinkubierten (2,5 µg/ml, 30 min) Zellen angesetzt, um die spezifische Partikelbindung an HER2-überexprimierenden Zellen herauszuarbeiten. Die FACS-Analysen wurden wie unter 2.7.5 beschrieben ausgeführt.

### **2.7.5.3 Einfluss der Partikelkonzentration auf die zelluläre Bindung**

Um den Einfluss der Partikelkonzentration auf die zelluläre Bindung zu untersuchen, wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von < 70% kultiviert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich zwischen 5,0 und 100 µg/ml anti-HER2-NP und unmodifizierten NP bei 37°C behandelt (n = 4). Die FACS-Analysen wurden wie unter 2.7.5 beschrieben ausgeführt.

### **2.7.6 Untersuchung der Zellverteilung von anti-HER2-NP mittels CLSM**

Die zelluläre Verteilung der anti-HER2-NP wurde in SK-Br-3-Zellen untersucht. Zellen wurden in einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Slide Flask ausplattiert und über Nacht adhären gelassen.

Zum Nachweis der Partikelaufnahme wurden die Zellen mit den entsprechenden NP-Zubereitungen in einer Konzentration von 100 µg/ml bei 37°C inkubiert. Eine Inkubationszeit von 3 h wurde für die Gelatine Nanopartikel gewählt, während die Versuche mit den HSA-Nanopartikeln für 1 h und 3 h festgelegt wurden. Inhibitionsexperimente beinhalteten eine Vorinkubation mit 2,5 µg/ml Trastuzumab für 30 min.

Anschließend wurde zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Eine Färbung der Membran wurde durch Inkubieren mit 500 µl Alexa-594 Concanavalin A 0,0005% über 2 min erreicht. Zur Fixierung der Zellen wurden sie mit 500 µl Paraformaldehyd-Lösung (4% in PBS) für 30 min behandelt. Daraufhin wurde zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Um ein dauerhaftes Präparat zu erhalten, wurden die Zellen in Vectashield™-Lösung eingebettet. Die Präparate wurden bis zur CLSM-Untersuchung bei 4°C unter Lichtausschluss aufbewahrt. Die CLSM-Aufnahmen wurden wie unter 2.6.5.2 durchgeführt.

### **2.7.7 Intrazelluläre Freisetzung von Cy5-ASO aus anti-HER2-NP**

Für die Experimente der intrazellulären Verteilungen eines Cy5-markierten ASO wurden Nanopartikel mit 300 µg Cy5-PTO-beladen. Ein Volumen von 1000 µl einer 2%igen HSA-Lösung (= 6,6 mg HSA pH 7,0) wurden mit 100 µg Cy5-PTO für 30min bei RT inkubiert, mit 2700 µl Ethanol desolvatisiert und die erhaltenen Partikel mit 4,70 µl einer 8%igen wässrigen Glutaraldehydlösung stabilisiert. Die Nanopartikel wurden wie unter 2.1.4 beschrieben aufgereinigt. Die Partikeloberfläche wurde wie unter 2.7.3.3 beschrieben modifiziert. Die Kontroll-Nanopartikel unterscheiden sich von den bisherigen eingesetzten Nanopartikel durch die Pegylierung der Partikeloberfläche.

Die intrazelluläre Freisetzung von Cy5-PTO aus anti-HER2-HSA-NP bzw. PEG-HSA-NP wurde nach Inkubationszeiten über 1 h, 6 h und 24 h untersucht und wie unter 2.6.5.3 durchgeführt. Das Cy5-markierte PTO absorbiert im CLSM bei einer Wellenlänge von 643 nm und emittiert bei einer Wellenlänge von 667 nm.



## 2.7.8 Quantifizierung der Transfektionseffizienz mittels FACS

CLSM-Untersuchungen ergaben, dass sich Cy5-PTO in Abhängigkeit vom Trägersystem (anti-HER2-HSA-NP vs. PEG-HSA-NP, 3.6.2.6) mehr oder weniger intrazellulär anreichert. Um die Transfektionseffizienz der anti-HER2-Nanopartikeln in Tumorzellen abschätzen zu können, wurde die zelluläre Aufnahme von Cy5-PTO mittels anti-HER2-HSA-NP, PEG-HSA-NP und DOTAP in SK-Br-3-Zellen verglichen. Für dieses Experiment wurden Nanopartikel mit 300 µg Cy5-PTO-beladen. Ein Volumen von 1000 µl einer 2%igen HSA-Lösung (= 6,6 mg HSA pH 7,0) wurde mit 100 µg Cy5-PTO für 30min bei RT inkubiert, mit 2700 µl Ethanol desolvatisiert und die erhaltenen Partikel mit 4,70 µl einer 8%igen wässrigen Glutaraldehydlösung stabilisiert. Die Nanopartikel wurden wie unter 2.1.4 beschrieben aufgereinigt. Die Partikeloberfläche wurde wie unter 2.7.3.3 beschrieben modifiziert. Die Kontroll-Nanopartikel unterscheiden sich von den bisherigen eingesetzten Nanopartikel durch die Pegylierung der Partikeloberfläche.

Die Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von < 70% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Nanopartikelproben in den Konzentrationen 100 nM, 250 nM, 500 nM und 1000 nM bei 37°C für 6 h inkubiert (n = 4). Als Kontrollen dienten DOTAP/Cy5-PTO in Konzentrationen von 10 nM, 50 nM und 100 nM. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert, zentrifugiert und in FACS-Puffer (3% bovines Serumalbumin und 0,5% Natriumazid in PBS) resuspendiert. Die FACS-Analysen wurden wie unter 2.7.5 beschrieben ausgeführt.

## 2.8 Nachweis des Antisense-Effektes

### 2.8.1 Chemikalien und Geräte

|                            |                             |
|----------------------------|-----------------------------|
| Trypanblaulösung           | Sigma, Steinheim            |
| Zählkammer                 | Assistent                   |
| LDH-Assay                  | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Triton X                   | Merck, Darmstadt            |
| MTT-Reagenz                | Sigma, Steinheim            |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck, Darmstadt            |
| DMSO                       | Fluka, Buchs, Schweiz       |
| 1N Salzsäure               | Merck, Darmstadt            |

---

Fluostar Galaxy

BMG Labtechnologies, Offenburg

Transfektionsstudien:

Eingesetzte Oligonukleotide:

MWG, Ebersberg

- Antisense-Sequenz: P12

5' acc agt ccg gag ggg agg gc 3'

- Scrambled-Sequenz: P12scr

5' gtg cga ccg cga gga gcg ag 3'

- Random-Sequenz: HSV

5' gcg gag gtc cat gtc gta gcg 3'

- Cy5-markiertes PTO: Cy5-PTO

Cy5 - 5' cta cga tct act ggc tcc at 3'

DOTAP Liposomal Transfection Reagent

Roche Diagnostic, Mannheim

Puffer:

HBS Puffer:

2 ml 1 M HEPES pH 7,4

Roth, Karlsruhe

876 mg NaCl

Merck, Darmstadt

ad 100,0 ml MQ-Wasser, steril filtriert

## 2.8.2 Eingesetzte Proben für den Nachweis des Antisense-Effektes

Für die Detektion des Antisense-Effektes wurden die oben beschriebenen PTO-beladenen Nanopartikelzubereitungen, die nach dem Standardprotokoll (siehe 2.1.4) hergestellt wurden, eingesetzt. Als Positivkontrolle diente das Transfektionsreagenz DOTAP. Das DOTAP Reagenz wurde in einem nach Herstellerangaben empfohlenem Massenverhältnis von 1 µg ASO zu 6 µg DOTAP eingesetzt. Eine PTO-Lösung in HBS-Puffer wurde auf eine Konzentration von 100 µg/ml eingestellt. Die DOTAP-Lösung entsprach einer Konzentration von 300 µg/ml. Es wurden PTO-Konzentrationen von 50 nM und 100 nM verwendet. Negativkontrollen entsprachen unbeladenen NP oder unbehandelten Zellen.

## 2.8.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels der traditionellen Trypanblau-Ausschlussfärbung durchgeführt. Zu je 20 µl der Zellsuspension wurden 20 µl der Trypanblaulösung hinzugesetzt. Die Zellen wurden in einer Zählkammer ausgezählt.

## 2.8.4 LDH-Test

Die Zerstörung der Zytoplasmamembran durch toxische Substanzen führt zur Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile. Auf diese Weise gelangen auch zytoplasmatische Enzyme in das Zellkulturmedium. Die meisten dieser Enzyme



werden schnell degradiert. Einige wenige allerdings sind so stabil, dass sie auch extrazellulär noch aktiv bleiben. So ist beispielsweise die Lactatdehydrogenase (LDH) auch außerhalb der Zelle sehr stabil. Im LDH-Assay wird die Aktivität des Enzyms durch die Umsetzung eines Formazansalzes nachgewiesen. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag des gelösten Salzes, den man photometrisch quantifizieren kann.

Der LDH-Assay wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Nach Inkubation mit den entsprechenden Zubereitungen wurden nach den jeweiligen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) 100,0 µl des Zellkulturüberstandes abgenommen und in eine neue Platte überführt. Anschließend wurde für 30 min bei 37°C mit dem LDH-Reagenz (Natriumlactat,  $\text{NAD}^+$ , Iodtetrazolchlorid, Diaphorase) inkubiert. Das aus den Zellen freigesetzte LDH setzt das Natriumlactat mit  $\text{NAD}^+$  als Coenzym zu Pyruvat um. Dabei entstehen  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Die Wasserstoffatome werden von der Diaphorase zur Reduktion des Iodtetrazolchlorids eingesetzt. Das gebildete Formazansalz besitzt eine rote Farbe und lässt sich bei 485 nm im Fluostar vermessen.

### 2.8.5 MTT-Test

Zur quantitativen Bestimmung der Viabilität von Zellen, die mit einer bestimmten Zubereitung inkubiert worden sind, wurde der vielfach gebräuchliche MTT-Test nach Mosmann durchgeführt [1983]. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausplattiert. Nach Inkubation mit den entsprechenden Zubereitungen wurde nach den jeweiligen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) 50 µl einer 2,5 mg/ml MTT-Lösung pro Well hinzugegeben. Zur Umwandlung von MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen in das blaugefärbte Formazan wurden die Zellen für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Kulturüberstände wurden abgenommen und die blauen Kristalle in den Zellen unter Zugabe von 100,0 µl einer 2,5 g SDS in DMSO und Zusatz von 500 µl Salzsäure 1,0 N gelöst. Die Absorption wurde bei 550 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader vermessen. Die Bestimmung erfolgte mit dreifachem Ansatz pro Inkubation.

Zur Auswertung wurde die mittlere Viabilität von unbehandelten Zellen als Referenzwert auf 100% gesetzt und die Messwerte behandelter Zellen nach Abzug von den Blindwerten rechnerisch auf diese Werte bezogen und als % mitochondriale Aktivität ausgedrückt.



### **3 Ergebnisse und Diskussion**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Evaluierung von Trägersystemen für Antisense-Oligonukleotide (ASO) auf der Basis von humanem Serumalbumin. Es wurde nach effizienteren und weniger toxischen Nanopartikel-formulierungen gesucht. Die entwickelten Nanopartikelzubereitungen wurden ausführlich hinsichtlich ihrer kolloidalen Parameter charakterisiert, die Beladungseffizienz und Beladungskapazität wurde untersucht, und eine gezielte Akkumulation in Brustkrebszellen durch Kopplung mit einem Antikörper für ein Drug-Targeting vorgenommen. Die Toxizität und Transfektionseffizienz der Nanopartikel wurde in Zellkultur getestet.

#### **3.1 Herstellung von ASO-beladenen HSA-NP**

Antisense-Oligonukleotide (ASO) sind hydrophile Moleküle, die aus einem Phosphoribose-Rückgrat bestehen, an das die Nukleobasen geknüpft sind. Infolge ihrer polyanionischen Struktur sind ASO geladene Makromoleküle mit eingeschränkter Fähigkeit Zellmembranen zu überwinden. Darüber hinaus sind besonders unmodifizierte ASO empfindlich gegenüber Nukleasen und werden rasch in biologischen Medien abgebaut. Daher wurde nach geeigneten ASO-Trägersystemen gesucht, um die ASO zum einen vor Abbau zu schützen und zum anderen effizienter über die Zellmembran zu transportieren.

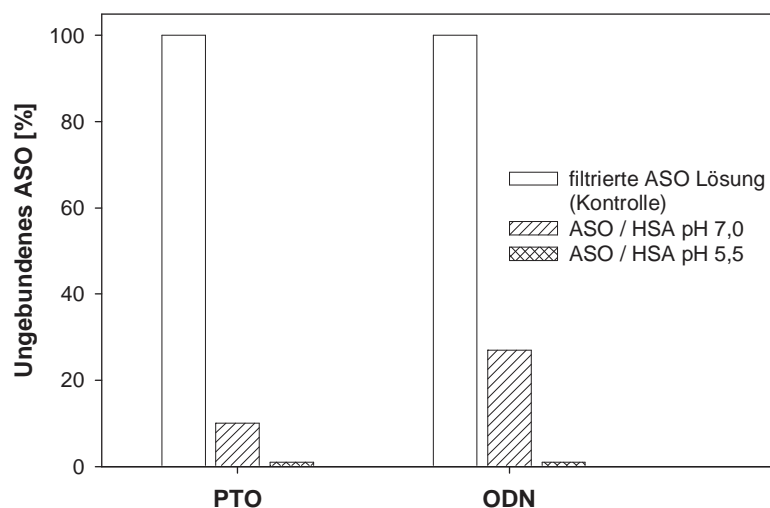
Im ersten Teil dieser Arbeit ging es um die Herstellung Protein-basierter Nanopartikel als Träger für ASO. Die Einbindung von ASO in Albumin-Nanopartikel ermöglicht einen besseren Schutz gegen Abbau durch Nukleasen verglichen zu anderen Bindungsstrategien wie Adsorption an die Partikelmatrix [Arnedo et al., 2002]. Die Partikel wurden nach einer gut charakterisierten Desolvationsmethode durch Zugabe von Ethanol hergestellt [Weber et al., 2000a].

##### **3.1.1 Adsorptionsversuch von ASO an gelöstes HSA**

Wie die meisten sauren Substanzen, binden ASO (IEP 1,5 – 4,5) an Albumin. Wechselwirkung zwischen ASO mit Plasmaproteinen wie Albumin wurden in verschiedenen früheren Studien untersucht [Geselowitz and Neckers, 1995; Srinivasan et al., 1995]. Übermäßig starke Bindung wurde erreicht, wenn ASO mit einem Überschuss an HSA inkubiert wurde. Die Bindungsstelle I für Arzneistoffe

innerhalb des HSA-Moleküls wurde als Hauptbindungsstelle für ASO identifiziert. Die eingesetzten Konzentrationen an HSA und PTO entsprachen den normalen physiologischen Albuminkonzentrationen (3% w/v) und PTO-Konzentrationen, die in früheren Bindungsversuchen von Srinivasan et al. beschrieben wurde [Srinivasan et al., 1995]. Eine starke Bindung zwischen Arzneistoff und Albuminmolekül wurde für unmodifizierte ASO und ebenso effizienter für modifizierte PTO beobachtet. In der vorliegenden Studie wurde die Wechselwirkungen zwischen ASO und Albuminmolekül bei verschiedenen pH-Werten untersucht, um eine optimale Adsorption zu erzielen, die für eine gute Einbindung in die Partikelmatrix nötig ist.

Abbildung 3.1: Bindungsaffinität von unmodifizierten Oligonukleotiden (ODN) und Phosphorothioat modifizierten Oligonukleotiden (PTO) bei verschiedenen pH-Werten an HSA in Lösung: 100 µg ASO wurden mit 6,6 mg HSA für 30 min inkubiert. Der ungebundene Anteil an ASO wurde nach Ultrafiltration bestimmt.



Mittels Ultrafiltration (siehe 2.1.2) konnte eine hohe Bindungsaffinität von modifizierten Oligonukleotiden wie den Phosphorothioaten (PTO) an Albuminmolekülen in Lösung gezeigt werden. Weniger als 10% bei pH 7,0 und 0,1% bei pH 5,5 des PTOs wurden nach Ultrafiltration von der Albuminlösung getrennt (Abbildung 3.1). Wird der pH-Wert der Albuminlösung von 7,0 auf 5,5 gesenkt, nimmt bei unmodifizierten Oligonukleotiden (ODN) die Adsorption an gebundenem ODN von 73% auf 99% zu. Eine Abnahme des pH-Wertes der Albuminlösung hat sowohl bei den ODN als auch den PTO eine gesteigerte Adsorption des ASO an Albuminmoleküle zur Folge. Dies kann auf eine verminderte Menge an negativ geladenen Gruppen im ODN-Molekül zurückgeführt werden, da bei pH-Werten nahe des isoelektrischen Punktes des Albuminmoleküls (IEP 5,3) die elektrostatische

Abstoßung zwischen Protein und Arzneistoff abnimmt. Diese Resultate widersprechen Ergebnissen, die bei einer Zunahme des pH-Wertes aufgrund einer Konformationsänderung des HSA-Moleküls eine höhere Bindungsaffinität für die Bindungsstelle I im HSA-Molekül belegen [Wilting et al., 1980a; Wilting et al., 1980b]. Da ASO eine gute Proteinbindung zeigen, kann bei solchen Proteinen davon ausgegangen werden, dass sie sich als Trägersysteme für diese Arzneistoffe eignen.

Der optimale pH-Wert für die Partikelherstellung mittels Desolvatation liegt bei pH 5,5, da hier das HSA-Molekül neutral bis leicht negativ geladen vorliegt und das große, hydrophile, anionische ASO eine verbesserte Bindungsaffinität aufweist. Daher wurde dieser pH-Wert für die Beladung von ASO in die Partikelmatrix bei der Partikelherstellung in den nachfolgenden Einbindungsversuchen gewählt.

### **3.1.2 Optimierung der Partikelherstellung**

Basierend auf den Ergebnissen der Adsorptionsversuche von ASO an freies HSA (siehe 3.1.1) und der Partikelherstellung für die Optimierung des Partikelabbaus (siehe 3.4.1.1), wurde ein vorläufiges Protokoll für die Herstellung von ASO-beladenen Nanopartikeln erstellt. Zunächst wurde eine konstante Menge von 100 µg ASO an 6,6 mg HSA bei pH 5,5 adsorbiert (siehe 2.1.3). Anschließend wurden die Nanopartikel durch Desolvatation mit Ethanol ausgeformt. Die Nanopartikel wurden mit Glutaraldehyd stabilisiert und durch Zentrifugieren und Resuspendieren in MQ-Wasser aufgereinigt. Um eine Optimierung der ASO-Beladung und der stabilen Einbindung von ASO in die Partikelmatrix zu erreichen, wurde die Partikelherstellung anhand folgender Parameter variiert: 1.) Menge an Desolvationsmittel Ethanol, 2.) Ausmaß der Quervernetzung im Bereich zwischen 40 und 200%, 3.) Einfluss der ASO-Modifikation (ODN vs. PTO) und der ASO-Kettenlänge (15mer vs. 20mer).

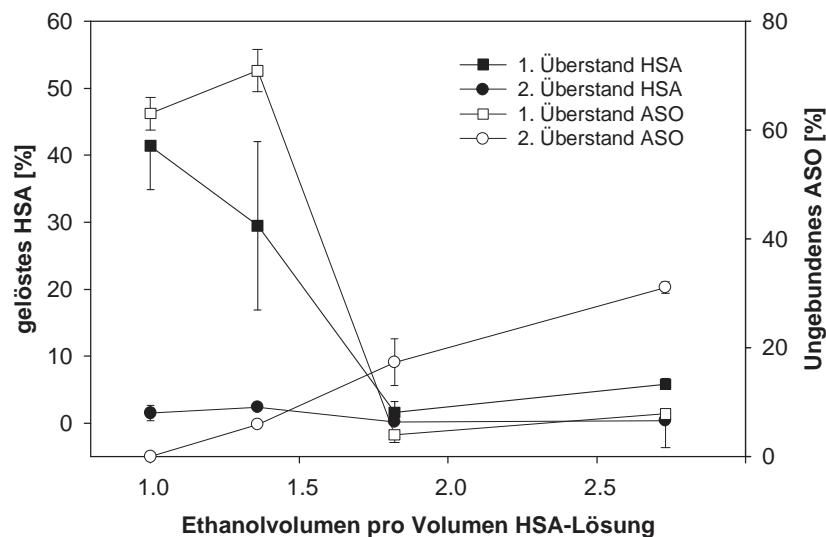
Hierbei entspricht eine Glutaraldehyd-Konzentration von 100% einer theoretischen Menge, die für eine quantitative Quervernetzung der 60 Aminogruppen im HSA-Molekül notwendig ist.

#### **3.1.2.1 Variation der Ethanolmenge**

Zuerst wurde eine HSA-Lösung mit einem 15mer ODN inkubiert (siehe 2.1.3) und durch Zugabe von verschiedenen Mengen an Ethanol desolvatisiert (Abbildung 3.2). Ab ca. einem 1,8-fachen Volumen an Ethanol wurden weniger als 8% ASO im ersten Partikelüberstand gefunden, das heißt, 92% ASO wurden in die Partikelmatrix gebunden. Die Ergebnisse korrelieren gut mit der abnehmenden Menge an freiem,

nicht desolvatisiertem HSA im Partikelüberstand. Im zweiten Partikelüberstand nahm die Menge an ungebundenem ODN leicht bis zu 31% mit steigender Ethanolmenge zu, während die freie Menge an HSA konstant blieb. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen von Weber et al. überein, bei denen es sich gezeigt hat, dass bis zu einem 2,2-fachen Volumen an Ethanol der Prozentsatz an gelöstem HSA stetig abnahm [Weber et al., 2000a].

Abbildung 3.2: Detektion von freiem ASO und gelöstem HSA nach Partikelherstellung in den Waschüberständen: Variation der Ethanolmenge (330  $\mu$ l, 450  $\mu$ l, 600  $\mu$ l, und 900  $\mu$ l) wurden für die Desolvation von 6,6 mg HSA in 330,0  $\mu$ l MQ-Wasser verwendet (Mittelwert  $\pm$  S.D.; n = 3).

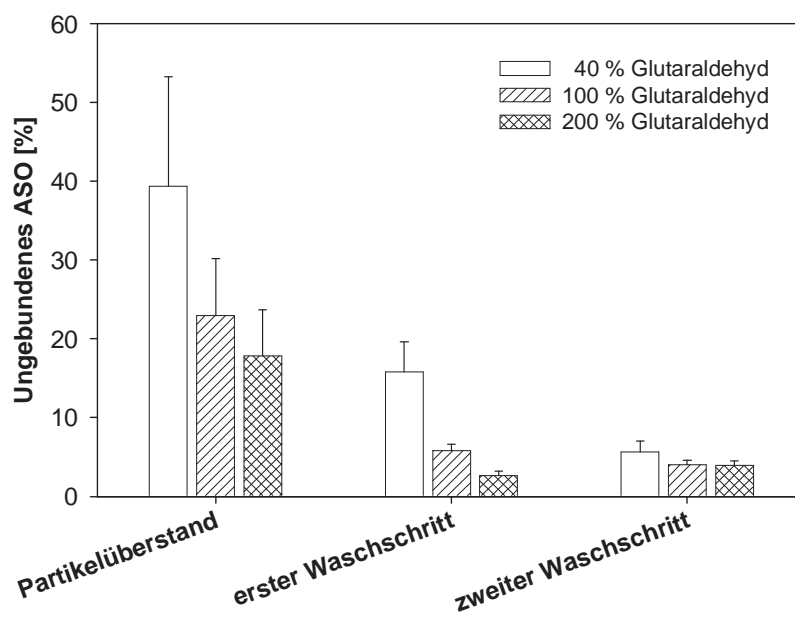


In Tabelle 3.1 **A** sind die entsprechenden Beladungseffizienzen dieser Partikel dargestellt. Eine höhere Menge an Desolvationsmittel erhöht die Beladungseffizienz. Beide Ergebnisse zeigen, dass eine Ethanolmenge von mindestens 600  $\mu$ l pro 330,0  $\mu$ l HSA-Lösung zur Desolvation erforderlich ist, um eine gute Beladungseffizienz zu erhalten. Ein Ethanolüberschuss von 900  $\mu$ l sollte eine vollständige Ausfällung des HSA begünstigen und aufgrund des gebundenen Anteils von ASO an freies HSA ebenso die Einbindung von ASO in die Partikelmatrix fördern.

### 3.1.2.2 Variation der Menge an Quervernetzung

Um das Ausmaß der Quervernetzung auf eine stabile ODN-Einbindung zu untersuchen, wurden Nanopartikel mit unterschiedlichen Mengen an Glutaraldehyd (40, 100 und 200%) stabilisiert (siehe 2.1.3). Die Stabilität der ODN-Einbindung in die Partikelmatrix während der Aufreinigungsschritte konnte mit höheren Mengen an Glutaraldehyd verbessert werden. Im ersten Überstand wurden 40% an ODN in freier Form nach der Quervernetzung mit 40% Glutaraldehyd gefunden, dagegen wurden bei einer 200%igen Quervernetzung nur 18% detektiert (Abbildung 3.3). Nach den ersten beiden Aufreinigungsschritten enthielt die Partikelmatrix ungefähr 45%, 71% und 80% an ODN nach entsprechender Quervernetzung mit 40%, 100% und 200% Glutaraldehyd (Tabelle 3.1 B).

Abbildung 3.3: Einfluss der Partikelstabilisierung mit verschiedenen Glutaraldehyd-Konzentrationen (40%, 100% und 200%) auf die ASO-Beladungseffizienz: Die Menge an freiem ASO wurde nach der Desolvation im Überstand, dem ersten und zweiten Waschschrift bestimmt (Mittelwert  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ ).



Das Ausmaß der ASO-Freisetzung ist hauptsächlich von der Partikelstabilisierung abhängig. Nimmt die Quervernetzung von 40% auf 200% Glutaraldehyd zu, führt dies zu einer stabileren ASO-Einbindung und höheren Beladungseffizienz. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen konnten Arnedo et al. [2002] keinen Einfluss des Quervernetzungsmittels Glutaraldehyd auf die ASO-Beladungseffizienz sehen. In der genannten Studie lagen die Konzentrationen des Glutaraldehyds jedoch sehr niedrig im Bereich zwischen 0,12% und 25,8%, was anderen Arbeiten zur

erforderlichen Minimalkonzentration von 40% widerspricht [Roser et al., 1998; Weber et al., 2000a]. Der Nachteil einer angeblich höheren Polydispersität bei höheren Glutaraldehydkonzentrationen, was von Arnedo et al. behauptet wurde, konnte nicht bestätigt werden. Die Stabilisierung der Partikel ist aufgrund der notwendigen Arzneistoff-Freisetzung jedoch eingeschränkt (siehe Partikelabbau 3.4.1.1 und Zellkultur 3.5.3).

### **3.1.2.3 Variation des ASO: ODN / PTO / Kettenlänge**

Weiterhin wurde der Einfluss der Rückgrat-Modifikation und der Kettenlänge des ASO auf die Beladungseffizienz untersucht (siehe 2.1.5). Der Einfluss der Kettenlänge (15mer vs. 20mer ODN), der Rückgrat-Modifikation (20mer ODN vs. 20mer PTO) und die Einführung einer endständigen Markierung (20mer PTO vs. 20mer Cy5-PTO) wurde untersucht.

In Tabelle 3.1 ist die Beladungseffizienz indirekt über die Differenz des eingesetzten ASO von im Überstand wiedergefundenem ASO bestimmt worden. Mit Zunahme der Kettenlänge des ASO ebenso wie der Austausch der ODN-Struktur gegen die PTO-Struktur ergab sich eine erhöhte Beladungseffizienz (Tabelle 3.1 **B** und **C**). Das 20mer ODN und das 20mer PTO führten beide zu einer gesteigerten Beladungseffizienz im Vergleich zu den erhaltenen Ergebnissen mit den entsprechenden 15mer ASO. Eine Einführung einer endständigen Fluoreszenzmarkierung (Cy5) zeigte keinen Einfluss auf die Beladungseffizienz. Es wurden ähnliche Beladungseffizienzen mit unmarkiertem 20mer PTO wie mit Cy5 markierten 20mer PTO von 94% erzielt (Tabelle 3.1 **C**).

In Abbildung 3.10 wurde die Menge an ungebundenem ASO im Partikelüberstand, den Waschschritten, so wie nach Partikelabbau aufgetragen. In allen Aufreinigungsschritten wurde ungebundenes ASO gefunden. Es kann angenommen werden, dass durch die Partikelaufreinigung nahe an der Oberfläche gebundenes ASO freigesetzt wird. Eine Einbindung von ca. 20,8% wurde mit einem 15mer PTO nach enzymatischem Abbau erhalten, während die eingebundene Menge an 15mer ODN ungefähr 3,7% betrug. Im Fall einer indirekten Bestimmung liegt die Beladungseffizienz bei 44,8% für das 15mer ODN bzw. 90,1% für 15mer PTO (siehe Tabelle 3.1). Die Diskrepanz zwischen ermittelter Beladungseffizienz von direkter und indirekter Bestimmung könnte durch eine Komplexbildung des ASO mit Albuminfragmenten vom Partikelabbau erklärt werden. An Albumin gebundenes ASO wird möglicherweise mittels HPLC nicht vollständig getrennt.



Die Kettenlänge des ASO beeinflusst die Beladung der HSA-NP signifikant [Chavany et al., 1992; Srinivasan et al., 1995]. Obwohl die Einschlusseffizienz mit der Kettenlänge und der Rückgrat-Modifikation zunimmt, war die Wiederfindung des ASO stets unzureichend.

Tabelle 3.1: Nanopartikelzubereitungen bezogen auf das Standardprotokoll: Optimierung der Beladungseffizienz unter verschiedenen Bedingungen: **A** Ethanolmenge, **B** Glutaraldehydkonzentration **C** Variation der ASO Rückgratmodifikation, Kettenlänge (15 und 20mer) und Markierung; unmodifiziertes (ODN) und Phosphorothioat modifiziertes (PTO) Antisense-Oligonukleotide). Die Beladungseffizienz wurde berechnet als Differenz zwischen Gesamtmenge an eingesetztem ASO und der Menge an ASO aus den ersten beiden Partikelüberständen; n = 3.

| Parameter   | Beladungseffizienz gebundenes ASO in % |      |
|---|--|------|
|   | Mittelwert                             | S.D. |
| <b>A</b> 15mer ODN, 330 µl Ethanol                    | 39,7                                   | 3,0  |
| 15mer ODN, 450 µl Ethanol                             | 23,2                                   | 3,4  |
| 15mer ODN, 600 µl Ethanol                             | 78,7                                   | 2,8  |
| 15mer ODN, 900 µl Ethanol                             | 61,1                                   | 3,6  |
| <b>B</b> 15mer ODN, 900 µl Ethanol, 40% Glutaraldehyd | 44,8                                   | 10,3 |
| 15mer ODN, 900 µl Ethanol, 100% Glutaraldehyd         | 71,2                                   | 6,8  |
| 15mer ODN, 900 µl Ethanol, 200% Glutaraldehyd         | 79,5                                   | 6,2  |
| <b>C</b> 15mer PTO, 900 µl Ethanol, 40% Glutaraldehyd | 90,1                                   | 2,6  |
| 20mer ODN, 900 µl Ethanol, 40% Glutaraldehyd          | 91,1                                   | 2,7  |
| 20mer PTO, 900 µl Ethanol, 40% Glutaraldehyd          | 94,7                                   | 2,4  |
| 20mer Cy5-PTO, 900 µl Ethanol, 40% Glutaraldehyd      | 93,8                                   | 2,2  |

#### 3.1.2.4 Variation der Aufreinigungsschritte

Einige Versuche wurden unternommen, die Waschschritte nach der Partikelherstellung zu verbessern, um die Beladungseffizienz zu steigern. Dies verlief erfolglos. Es muss vermutet werden, dass der Arzneistoffverlust während den Aufreinigungsschritten auf einem Desorptionsprozess von nahe der Oberfläche gebundenen ASO beruhte. Im Experiment, das den Einfluss der Quervernetzung auf die Einbindung des ASO untersuchte, bestätigte sich diese Vermutung. Eine höhere Quervernetzungsdichte auf der Partikeloberfläche führte zu einer verminderten ASO-Desorption [Gupta et al., 1986; Lin et al., 2001].

### 3.1.2.5 Standardprotokoll: Beladung von HSA-NP mit ASO

Der Desolvationsprozess von HSA mit organischen Lösungsmittel und anschließender Quervernetzung mit Glutaraldehyd wurde ausführlich von Weber et al. [2000a] untersucht und charakterisiert. Diese Herstellungsmethode wurde weiterentwickelt und für die Einbindung von ASO in HSA-NP optimiert.

Eine optimale Partikelherstellung mit hoher Arzneistoffbeladung wurde unter folgenden Parametern erreicht: Eine Menge von 100 µg PTO wurde bei pH 5,5 an 6,6 mg HSA adsorbiert. Die Ausfällung des HSA wurde durch Zugabe von einem 2,7-fachen Volumenüberschuss an Ethanol erreicht. Die Partikelmatrix wurde mit 40% oder 200% Glutaraldehyd stabilisiert, um entweder einen guten enzymatischen Partikelabbau oder eine hohe Beladungsstabilität zu gewährleisten.

Bei der Optimierung des ASO-Trägersystems erwies sich der Stabilisierungsprozess der Partikelmatrix als besonders wichtiger Parameter [Jones et al., 1989]. Eine Minimalmenge an Glutaraldehyd war notwendig für die Herstellung von stabilen Nanopartikeln und für eine stabile Einbindung des ASO. Auf der anderen Seite sollte nach dem Stabilisierungsprozess ein enzymatischer Partikelabbau nach zellulärer Aufnahme der Partikel möglich sein. Ebenso sollten die NP geeignet sein für eine *in vitro* Degradation der Partikel zur Quantifizierung des matrixgebundenen ASO. Daher wurde die Nanopartikelmatrix mit definierten Mengen an bifunktionalem Glutaraldehyd stabilisiert. Die niedrigste erforderliche Glutaraldehyd-Konzentration für die Herstellung von stabilen NP lag bei 40% der theoretischen Menge, die notwendig ist die 60 Aminogruppen im HSA-Molekül quantitativ quervernetzen [Weber et al., 2000a].

Bei ASO-beladenen und unbeladenen Nanopartikeln wurde ein ähnliches negatives Zetapotential gemessen. Dies verstärkt die Annahme, dass eine Einbindung des ASO in die Partikelmatrix eher als eine Adsorption an die Partikeloberfläche erfolgte. Obwohl das ASO eine mangelnde Stabilität in sauren Medien aufweist, war das ASO nach der Partikelherstellung gut geschützt in der Partikelmatrix eingebettet. Nach Abbau der Partikelmatrix wurden keine Abbauprodukte des ASO mittels HPLC detektiert.

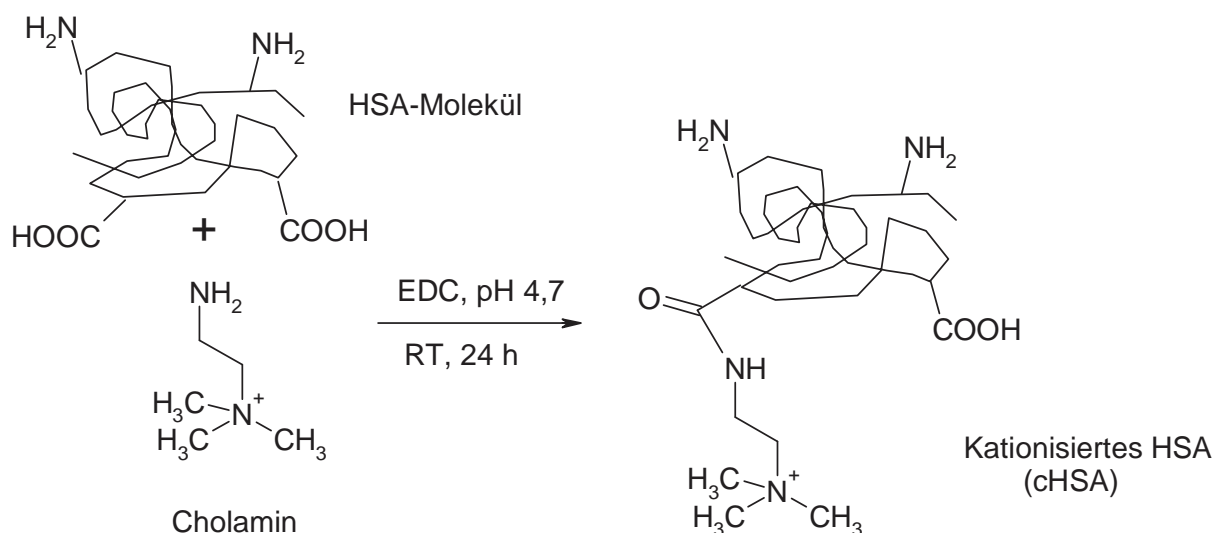
## 3.2 Einbindung von ASO in kationisierte HSA-NP

Durch eine Kationisierung des Albuminmoleküls wurde versucht, die Einbindung des Oligonukleotides mit polyanionischem Grundgerüst zu verbessern. Bisher eingesetzte kationische Polymere zeigten eine zu starke Eigentoxizität. Der Einsatz von kationisiertem HSA (cHSA) ist ein neuer Ansatz, um die Toxizität der polymerbasierten Transfektionssysteme zu reduzieren.

### 3.2.1 Kationisierung von HSA

Die freien Carboxylgruppen im HSA-Molekül wurden mit EDC aktiviert und mit Cholin umgesetzt (Abbildung 3.4). Um die erfolgreiche Kationisierung des HSA zu prüfen, wurde eine Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet (siehe 2.2.2). Der isoelektrische Punkt (IEP) des nativen Albumins liegt bei 5,3. Das unmodifizierte Albumin wanderte auf dem Polyacrylamidgel in einem Laufpuffer von pH 8,0 zur Anode, wie in Abbildung 3.5 dargestellt wurde. Dagegen verblieb das kationisierte Albumin beinahe vollständig in den Eingabetaschen, was auf einen höheren IEP hinweist, der über 8,0 liegt, da das verwendete Puffersystem auf einen pH von 8,0 eingestellt worden war.

Abbildung 3.4: Kationisierung von gelöstem HSA in MES Puffer pH 4,7: Umsetzung mit EDC und Cholin



Ein höherer IEP bedeutet, dass die Zahl der freien Carboxylgruppen im HSA-Molekül durch die Umsetzung dieser Gruppen mit Cholin abnimmt. Die Umsetzung ist erfolgreich verlaufen.

Abbildung 3.5: Detektion von [1] kationisiertem und [2] unmodifiziertem Albumin unter nicht denaturierenden Bedingungen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (12,5%), 20 µg Protein pro Bahn, 120 mA, Coomassie Blaufärbung



### 3.2.2 Variation des pH-Wertes und der Menge an kationisiertem HSA bei der NP-Herstellung

Phosphorothioat Oligonukleotid (PTO) beladene cHSA-Nanopartikel wurden durch die Desolvatation einer wässrigen cHSA/HSA Lösung unter Zugabe von Ethanol hergestellt (siehe 2.2.3). Der pH-Wert der cHSA/HSA-Lösung wurde mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH 5,5, 6,0, 7,0 oder 8,0 eingestellt, die Lösung anschließend mit 100 µg PTO inkubiert und mit Ethanol desolvatisiert. Verschiedene Mengen an cHSA im Bereich zwischen 0 und 40% (m/m) wurden eingesetzt. Die Partikelherstellung verlief am erfolgreichsten bei einem pH-Wert über 5,5. In diesem pH-Bereich konnte die Bildung von Mikropartikeln anstelle von Nanopartikeln minimiert werden. Eine Übersicht der Partikelcharakteristika liefert Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2: Charakterisierung von PTO-beladenen cHSA-Nanopartikeln: die Partikelherstellung erfolgte bei einem pH-Wert von 8,0.

| Verhältnis<br>HSA:cHSA | Partikelgröße<br>[nm] | Polydisp. | Partikelgehalt<br>[mg/ml] | Beladungseffizienz<br>[%] | IEP  |
|------------------------|-----------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|------|
| 1:0                    | 162                   | 0,052     | 2,3                       | 4,41                      | 5,26 |
| 19:1                   | 197                   | 0,250     | 3,2                       | 31,72                     | 5,29 |
| 9:1                    | 271                   | 0,382     | 4,6                       | 45,37                     | 5,27 |
| 8:2                    | 272                   | 0,025     | 5,9                       | 29,07                     | 5,34 |
| 7:3                    | 263                   | 0,033     | 4,9                       | 15,86                     | 5,80 |
| 6:4                    | 427                   | 0,147     | 4,0                       | 6,61                      | 6,14 |

Eine Zunahme an cHSA in der Partikelmatrix führte zu einer besseren Partikel- ausbeute und erreichte ein Maximum bei einem Massenverhältnis von 20% cHSA.

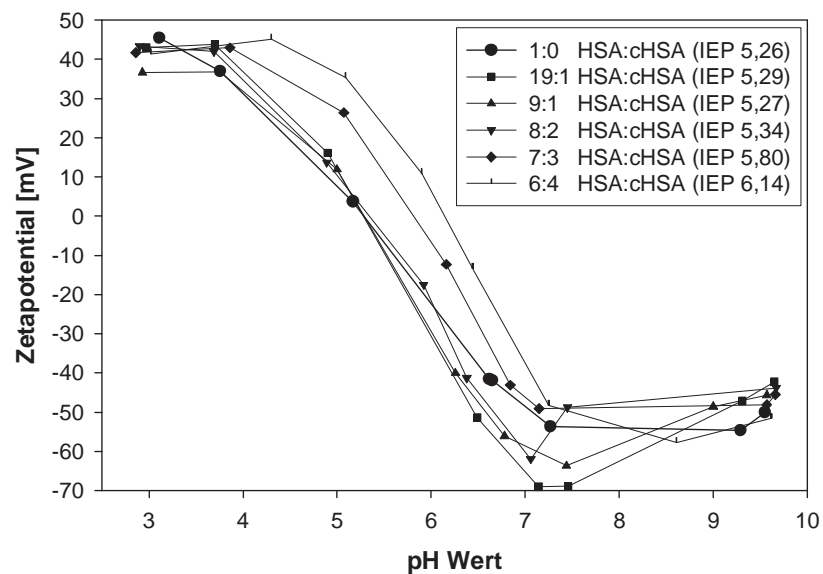
Der IEP der entstandenen Nanopartikel gibt einen Hinweis auf die Inkorporation von kationisiertem HSA in die Partikelmatrix. Wenn die eingesetzte Menge an kationisiertem HSA zunimmt, nimmt der IEP der Partikel ebenso zu. Abbildung 3.6 zeigt Titrationskurven dieser Nanopartikel mit einer Verschiebung des IEP von 5,26 in Abwesenheit von cHSA zu 6,14 bei der höchsten cHSA Konzentration. Ab einem Massenverhältnis von 7:3 HSA zu cHSA wird die negative Ladung des PTO durch cHSA kompensiert und der IEP des Partikelsystems steigt an. Die erhaltene Beladungseffizienz ist hervorragend. Im Vergleich zu reinen Albumin-Nanopartikeln ist die Beladungseffizienz bei den cHSA-NP um das bis zu 10,3-fache gesteigert.

Doch ein großer Nachteil der cHSA-NP mit höherem cHSA-Anteil besteht darin, dass die PTO eine starke Bindung zu den quartären Ammoniumgruppen des kationischen HSA-Moleküls ausbildet. Die Folge dieser hohen Affinität ist ein unvollständiger enzymatischer Partikelabbau bei höheren Konzentrationen an cHSA. Als Ergebnis nimmt die Freisetzungsgeschwindigkeit ab. Ein Kompromiss muss erzielt werden, damit ein ideales Trägersystem für die PTO etabliert werden kann. Die zu bevorzugende Menge an cHSA liegt bei einem HSA:cHSA-Verhältnis von weniger als 8:2, jedoch mindestens 19:1.

### **3.2.3 Einfluss des Zetapotentials auf die zelluläre Aufnahme**

Das Zetapotential der Nanopartikel scheint einen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Partikelaufnahme und intrazelluläre Verteilung der NP zu besitzen [Panyam et al., 2002]. Das Zetapotential der cHSA-NP wurde in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht (Abbildung 3.6). Das positive Zetapotential der NP im sauren pH-Bereich ergibt sich aus den protonierten Aminogruppen. Die Titration in alkalische Richtung führt zu einer Abnahme der protonierten Aminogruppen und zu einer Zunahme der deprotonierten Carboxylgruppen. Der Punkt des Ladungsausgleiches wird im Bereich zwischen pH 5,2 und 6,1 erreicht. Bei höheren pH-Werten kehrt sich das Vorzeichen des Zetapotentials um und negative Werte erscheinen.

Abbildung 3.6: Einfluss der cHSA-Konzentration 0 – 40% auf das Zetapotential und den isoelektrischen Punkt (IEP) der PTO-beladenen cHSA-Nanopartikel

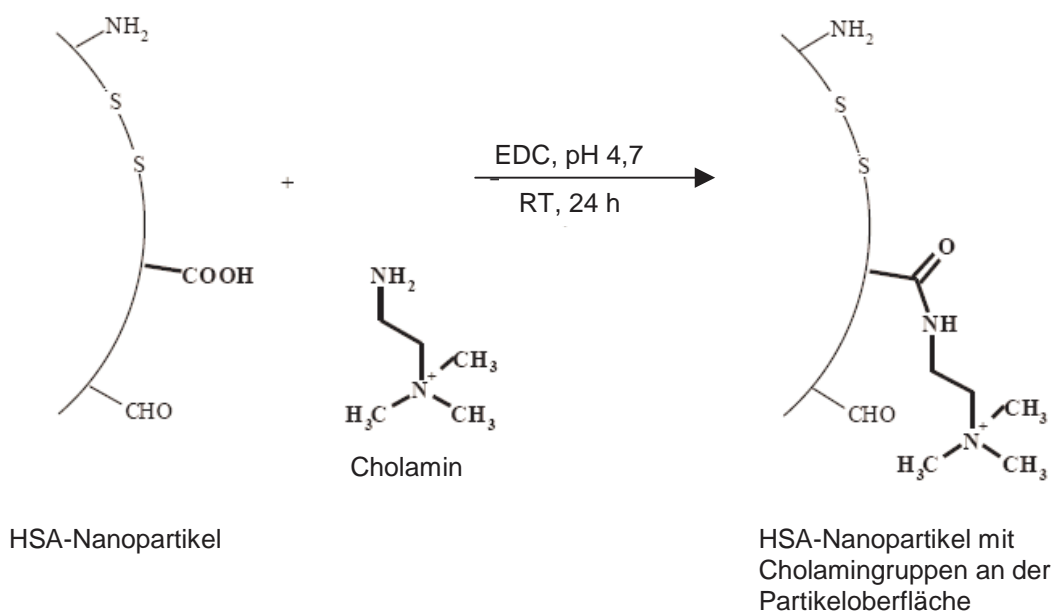


Die Kationisierung der NP könnte die Freisetzung aus endozytotischen Vesikeln erklären. Die frühen endozytotischen Vesikel haben einen physiologischen pH-Wert, bei dem die NP eine insgesamt negative Ladung aufweisen und dadurch wohl von der negativ geladenen endosomalen Membran abgestoßen werden. Jedoch sind die sekundären Endosomen und Lysosomen vorherrschend sauer, mit pH-Werten im Bereich zwischen 4 und 5. Bei diesem pH-Wert würden die NP eine insgesamt positive Ladung besitzen, daher mit der negativ geladenen Membran interagieren und schließlich in das zytosolische Kompartiment freigegeben werden. Dieses Phänomen wurde mit PLGA-NP im Detail untersucht [Panyam et al., 2002]. Eine Änderung der Oberflächenladung setzte die Partikel in das zytosolische Kompartiment frei, während dagegen permanent negativ geladene Polystyren-NP im Lysosom verblieben.

### 3.3 Adsorption von ASO an Oberflächen-kationisierte HSA-NP

Die Einführung permanent positiv geladener Gruppen an die Oberfläche von HSA-NP erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei der Umsetzung von gelöstem HSA zu kationisiertem HSA. Die Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche werden mit EDC aktiviert und mit Cholinamin umgesetzt (Abbildung 3.7).

Abbildung 3.7: Reaktionsschema der Umsetzung von HSA-Nanopartikeln mit EDC/Cholinamin



Oberflächen-modifizierte kationische Nanopartikel ( $\text{NP}^+$ ) besitzen die Fähigkeit direkt PTO an die Partikeloberfläche zu binden, ohne dass ein Zusatz von anderen möglicherweise toxischen Substanzen erforderlich ist. Der pH-Bereich in biologischen Systemen ist im Allgemeinen begrenzt auf Werte um pH 7. Um eine stabile und verlängerte PTO Beladung an die Partikeloberfläche zu erzielen, wurde der Adsorptionsprozess bei pH 7,0 durchgeführt und optimiert (siehe Tabelle 3.3). Erwartungsgemäß aufgrund der pH-sensitiven Gruppen der Albumin-Nanopartikel, ist das Zetapotential stark vom pH-Wert des Dispersionsmediums abhängig. Daher zeigt die Adsorption von ASO an unmodifizierte HSA-NP aufgrund ihrer negativen Oberflächenladung bei pH 7,4 eine extrem niedrige Beladungskapazität von  $0,75 \mu\text{g}/\text{mg NP}$  [Arnedo et al., 2002].

Tabelle 3.3 Einfluss der PTO-Menge auf das Zetapotential und die Adsorptionseffizienz; Inkubation verschiedenen PTO-Konzentrationen mit 1 mg NP+ für 1 h bei RT

| <b>µg PTO / mg NP+</b> | <b>Zetapotential<br/>[mV]</b> | <b>Adsorptionseffizienz<br/>[%]</b> |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| <b>0</b>               | +38,6                         | -                                   |
| <b>10</b>              | +30,9                         | 100                                 |
| <b>20</b>              | +28,1                         | 100                                 |
| <b>30</b>              | +26,3                         | 100                                 |
| <b>40</b>              | +26,3                         | 100                                 |
| <b>50</b>              | +22,3                         | 100                                 |
| <b>100</b>             | +2,9                          | 99,4                                |

Die Einführung quartärer Ammoniumgruppen auf der Albuminpartikeloberfläche führt zu einer positiven Partikeloberflächenladung von +38,6 mV in MQ-Wasser (siehe 2.3.1). Die Beladung der NP+ mit PTO wurde über die Bildung von Ionenpaaren zwischen den positiven Ammoniumgruppen auf der Partikeloberfläche und dem polyanionischen ASO-Rückgrat erreicht (siehe 2.3.3). Größere Mengen an PTO führen zu einer Abnahme des Zetapotentials (Tabelle 3.3). Eine Menge von 100 µg PTO sättigt die positiven Gruppen ab und das Zetapotential nähert sich 0 mV. Bei dieser Konzentration wurde eine geringe Menge an freiem PTO im Überstand gefunden. Die erhaltene Beladungseffizienz entspricht beinahe 100% und die Beladungskapazität ist 100 µg/mg NP.

Die ASO-Beladung durch elektrostatische Ionenpaarbindung wurde von einigen Arbeitsgruppen untersucht. Eingesetzte Polymere waren Polystyren [Elaissari et al., 1994; Fritz et al., 1997] und modifizierte Polymethylmethacrylate [Tondelli et al., 1998; Zobel et al., 1999]. Da es sich bei diesen Trägersubstanzen um nicht biodegradierbare synthetische Polymere handelt, können diese Nanopartikelzubereitungen nur als Modellträgersysteme für ASO genommen werden. Aufgrund der guten Biodegradierbarkeit und Biokompatibilität von Albumin lässt sich folgern, dass Albumin-NP, die an der Oberfläche mit einer permanent positiv geladenen Gruppe modifiziert wurden, ein gutes ASO-Trägersystem darstellen. Basierend auf früheren Daten kann davon ausgegangen werden, dass das PTO stabil an die Partikeloberfläche gebunden, vor enzymatischen Abbau geschützt, und von Zellen in beschleunigtem Maße aufgenommen wird [Elaissari et al., 1994; Fritz et al., 1997; Tondelli et al., 1998; Zobel et al., 1999].



### 3.4 Bestimmung des ASO-Gehaltes in NP

Prinzipiell existieren zwei Möglichkeiten, die ASO-Beladungseffizienz der NP zu bestimmen. Die indirekte Bestimmung der ASO-Menge ist die Detektion des ASO im Partikelüberstand nach der Aufreinigung und die Berechnung der Differenz zwischen eingesetzter ASO-Gesamtmenge und der Wiederfindung aus den Überständen.

Die zweite Möglichkeit ist die Bestimmung des ASO-Gehaltes auf direktem Weg. Die ASO-Menge in der Partikelmatrix wird quantitativ nach Partikelabbau bestimmt. Vergleicht man beide Möglichkeiten, bietet die direkte Bestimmung des ASO in der Partikelmatrix den Vorteil, die Menge an intakt eingebundenem ASO zu detektieren.

Es gibt einige Möglichkeiten, Protein-basierte Nanopartikel abzubauen: auf 1.) pH-abhängigen Weg oder 2.) enzymatischen Weg. Da ASO nicht unter sauren Bedingungen stabil sind, müsste die Partikelmatrix unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von 1 N NaOH abgebaut werden. Eine alternative Methode stellt der enzymatische Abbau unter Verwendung von Trypsin dar [Lin et al., 2001]. Eine andere Möglichkeit bietet der Abbau mit Proteinase K, was normalerweise für die RNA-Isolierung angewandt wird [Raubert et al., 1986].

#### 3.4.1 Direkte Bestimmung mittels Partikelabbau

Die Nanopartikelmatrix kann zum einen durch Inkubation mit Trypsin- oder zum anderen mit Proteinase K-Lösung abgebaut und auf die eingebundene Menge an ASO analysiert werden. Inkubationsversuche mit beiden Enzymen ergaben, dass die Stabilität des Arzneistoffes wegen der Enzym-Spezifität für Peptidbindungen nicht beeinflusst wurde.

##### 3.4.1.1 Partikelherstellung mit unterschiedlicher Quervernetzung

Nanopartikel aus humanem Serumalbumin (HSA) wurden mittels Desolvatation aus einer wässrigen Albuminlösung unter Zugabe von Ethanol hergestellt. Die Nanopartikel wurden durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd stabilisiert. Um den Einfluss der Glutaraldehydmenge auf die Partikelstabilität zu untersuchen (siehe 2.5.4.1), wurden verschiedene Mengen einer 8%igen Glutaraldehydlösung (zwischen 4,7 µl und 10,6 µl) zugesetzt. Dies entspricht 40% bis 90% der theoretischen Menge an Glutaraldehyd, die für eine quantitative Umsetzung der 60 Aminogruppen im Albuminmolekül der Partikelmatrix nötig ist. Es wurden Nanopartikel im Größenbereich von 290 bis 330 nm erhalten (Tabelle 3.4). Der Polydispersitätsindex

lag im Bereich von 0,0489 bis 0,0818, was auf eine monodisperse Partikelgrößenverteilung hinweist. Eine nahezu quantitative Desolvatation des Proteins während der Partikelherstellung wurde erzielt. Die Menge an nicht desolvatisiertem HSA betrug weniger als 7%. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Ergebnissen von Weber et al. [2000a] überein.

Tabelle 3.4 Charakterisierung von HSA-Nanopartikeln mit unterschiedlicher Menge Glutaraldehyd stabilisiert; Glutaraldehyd-Konzentrationen im Bereich zwischen 40% und 90%

|                            |                 |
|----------------------------|-----------------|
| Partikelgröße              | 290 - 330 nm    |
| Polydispersität            | 0,0489 - 0,0818 |
| nicht desolvatisiertes HSA | 0 – 7%          |

## 3.4.1.2 Enzymatischer Partikelabbau

Trübungsmessungen zeigten, dass die enzymatische Biodegradierbarkeit der HSA-NP hauptsächlich durch das Ausmaß der Quervernetzung beeinflusst wurde. Für beide Enzyme Trypsin (Abbildung 3.8) und Proteinase K (Abbildung 3.9) nahm die Abbaugeschwindigkeit mit steigender Quervernetzung der Partikelmatrix stark ab.

Abbildung 3.8 Enzymatischer Abbau von HSA-Nanopartikeln in Gegenwart von Trypsin: Einfluss der Glutaraldehyd-Konzentration (40 – 90%) für die erforderliche Partikelstabilisierung auf die Nanopartikelkonzentration nach Inkubation mit 50 µg/ml Trypsin

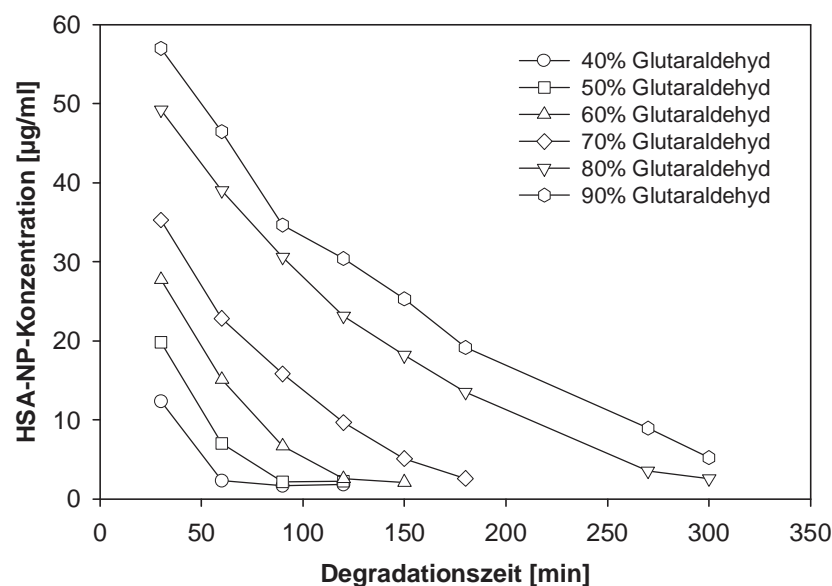
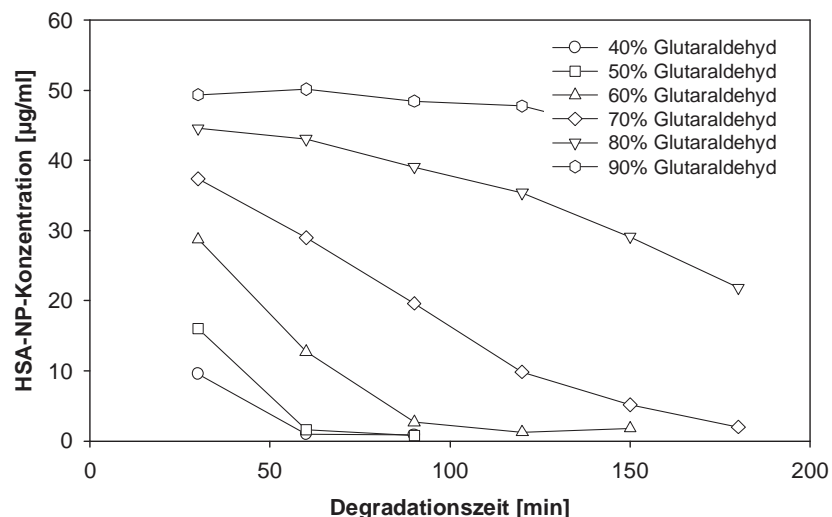


Abbildung 3.9 Enzymatischer Abbau von HSA-Nanopartikeln in Gegenwart von Proteinase K: Einfluss der Glutaraldehyd-Konzentration (40 – 90%) für die erforderliche Partikelstabilisierung auf die Nanopartikelkonzentration nach Inkubation mit 2 µg/ml Proteinase K



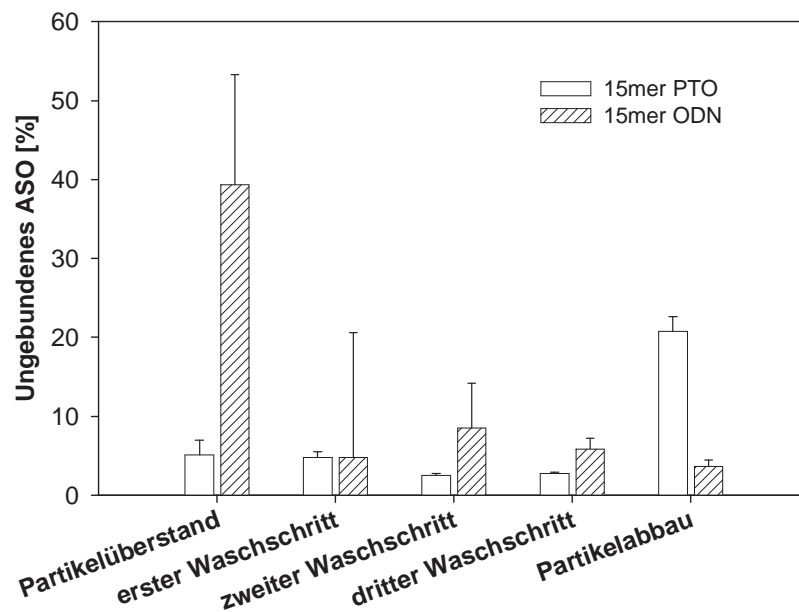
Enzymatischer Abbau der HSA-NP konnte erfolgreich bei einer Konzentration von 40% Glutaraldehyd durchgeführt werden, wobei innerhalb von 60 min die Partikelmatrix vollständig abgebaut werden konnte.

### 3.4.2 Wiederfindungsrate des ASO

Während der Partikelaufreinigung wurde ein größerer Anteil an ASO aus der Partikelmatrix freigesetzt. Der verbleibende Anteil an ASO in der Partikelmatrix war ziemlich niedrig. Die Gesamtwiederfindung des ASO, berechnet als Summe des freien ASO in den Partikelüberständen und des aus der Partikelmatrix freigesetzten ASO, lag bei 58,9% für ODN bzw. bei 36,0% für PTO (siehe Abbildung 3.10 und Tabelle 3.1). Dabei wurde nach enzymatischem Partikelabbau sehr wenig ASO in der Partikelmatrix gefunden: für ODN lag der Wert bei 3,7% und PTO bei 20,8%. Zu erwarten wären Werte von 44,8% für ODN und 90,1% für PTO gewesen. Diese unzureichende Wiederfindung beruht wahrscheinlich auf Wechselwirkungen zwischen HSA und ASO in den Überständen der Partikelaufreinigung und nach Partikelabbau. Eine vergleichbare Beobachtung wurde für andere Arzneistoffe beschrieben [Lin et al., 2001]. Dabei handelt es sich um 2 vorliegende Formen des Arzneistoffes: eine freie Form und eine an HSA gebundene Form, welche einen anderen Extinktionskoeffizienten besitzt und daher schwierig zu detektieren ist.

Die Einbindung von einem 15mer PTO in die Partikelmatrix ist aufgrund der besseren Wechselwirkung der PTO-Struktur zum HSA-Molekül erfolgreicher als die eines ODN.

Abbildung 3.10: Einfluss der ASO-Modifikation auf die Beladungseffizienz der HSA-NP: Die Menge an unmodifizierten ODN und modifizierten Phosphorothioat (PTO) wurde im Überstand, den Waschschritten und nach enzymatischer Partikeldegradation bestimmt (Mittelwert  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ )



### 3.4.3 Vergleich der Beladungseffizienz und der Beladungskapazität

Die Beladungseffizienz und Beladungskapazität für cHSA-NP und Oberflächenkationisierte NP+ ist in Tabelle 3.5 dargestellt. NP+ adsorbieren PTO sehr effizient und nahezu vollständig. Nach 1 h Inkubation in Zellkulturmedium wurden weniger als 10% an PTO durch Serumproteine verdrängt.

Tabelle 3.5: Vergleich der Beladungseffizienz und Beladungskapazität von PTO-beladenen cHSA-NP mit PTO adsorbiert an Oberflächen-kationisierte Nanopartikel (NP+) für die Anwendung in Zellkulturexperimenten (n = 3)

| Proben                                      | Beladungseffizienz [%] | Beladungskapazität [ $\mu\text{g}$ PTO / mg NP] |
|---|------------------------|---|
| <b>NP+ PTO</b><br><b>[MQ-Wasser]</b>        | 100,0 $\pm$ 0,0        | 100,0 $\pm$ 0,0                                 |
| <b>NP+ PTO</b><br><b>[Zellkulturmedium]</b> | 91,7 $\pm$ 4,3         | 91,7 $\pm$ 4,3                                  |
| <b>19:1 P12</b>                             | 11,0 $\pm$ 6,0         | 7,0 $\pm$ 6,1                                   |
| <b>19:1 P12scr</b>                          | 22,8 $\pm$ 10,6        | 6,7 $\pm$ 3,1                                   |
| <b>19:1 HSV</b>                             | 40,0 $\pm$ 6,0         | 10,9 $\pm$ 4,4                                  |
| <b>9:1 P12</b>                              | 57,5 $\pm$ 18,7        | 18,3 $\pm$ 5,0                                  |
| <b>9:1 P12scr</b>                           | 65,7 $\pm$ 10,1        | 24,2 $\pm$ 3,9                                  |
| <b>9:1 HSV</b>                              | 42,9 $\pm$ 20,1        | 12,1 $\pm$ 4,4                                  |

Die Beladungseffizienz lässt erkennen, dass bei einem HSA:cHSA-Verhältnis von 9:1 die Einbindung von PTO ausgeprägter ist als bei einem Verhältnis von 19:1. Dadurch verbessert sich auch das PTO:NP-Verhältnis bei einem HSA:cHSA-Polymerverhältnis von 9:1 verglichen zu 19:1. Die Schwankungen der Werte für die Beladungseffizienz wie auch die daraus resultierenden Ladungskapazitäten für die verwendeten PTO sind jenseits der gewünschten Reproduzierbarkeit. Obwohl die PTO sich untereinander strukturell kaum unterscheiden, variieren die Beladungseffizienzen der verschiedenen PTO-Typen unerwartet stark. P12 und P12scr setzen sich aus den gleichen 20 Nukleotidbausteinen zusammen, unterscheiden sich jedoch in der Reihenfolge dieser Bausteine, während dagegen das HSV aus 21 Nukleotiden und einem etwas niedrigerem G/C Anteil von 66% besteht verglichen mit 75% für P12 und P12scr. Daher ist die Bestimmung der Ladungskapazität für jeden Ansatz individuell durchzuführen. Trotzdem korreliert der Trend einer verbesserten Inkorporation von PTO mit einer zunehmenden eingesetzten cHSA-Konzentration.

## **3.5 Zellkultur**

### **3.5.1 Partikelstabilität in Zellkulturmedium**

Die bei der Partikeloptimierung erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass HSA-Nanopartikel, ebenso cHSA-Nanopartikel, ein vielversprechendes Trägersystem für ASO darstellen. Für eine Zellanreicherung sollte der Arzneistoff in der Zelle freigesetzt werden. Hierfür ist eine hohe Beladungsstabilität im Medium oder Blut erforderlich.

#### **3.5.1.1 Albumin-Nanopartikel (HSA-NP)**

Mittels Trübungs- und Partikelgrößenmessungen wurde die Partikelstabilität von HSA-NP in verschiedenen Zellkulturmedien (McCoy's 5a, Leibovitz L-15, RPMI 1640, DMEM, DMEM F-12 supplementiert mit FCS) bei 37°C über einen Zeitraum von 48 h untersucht (siehe 2.6.4). Es ergaben sich keine Unterschiede in der Partikelgröße sowie Partikelkonzentration im Medium (Tabelle 3.6), sodass von einer hohen Stabilität der HSA-NP unter Zellkulturbedingungen ausgegangen werden kann.

#### **3.5.1.2 Oberflächen-kationisierte Albumin-NP (NP+)**

Unbeladene NP+ und PTO-beladene NP+ wurden in Zellkulturmedium charakterisiert (siehe 2.3.3). Im Vergleich zu Zetapotentialmessungen in MQ-Wasser wurde das Zetapotential in Zellkulturmedium durch die enthaltenen Serumproteine beeinflusst. Sowohl unbeladene als auch PTO-beladene NP+ zeigten in Gegenwart von Zellkulturmedium ein negatives Zetapotential von -15,4 bzw. -22,3 mV (Tabelle 3.7). Die Messung der Partikelgröße in Zellkulturmedium zeigte eine Tendenz der NP+ zur Partikelagglomeration und ein hoher Polydispersitätsindex der unbeladenen und beladenen NP+ unterstreicht die Instabilität der Proben in Zellkulturmedium.

Tabelle 3.6: Partikelstabilität in verschiedenen Zellkulturmedien wurde ermittelt durch Bestimmung der Partikelgröße von 40% quervernetzten HSA-Nanopartikeln nach Inkubation bei 37°C für 48 h.

| Zell-Linie | Inkubationsbedingungen |                  | Partikelgröße [nm]   |                      |
|------------|------------------------|------------------|----------------------|----------------------|
|            | Zellkulturmedium       | NP-Konzentration | nach der Herstellung | nach 48 h Inkubation |
| SK-Br-3    | Mc Coy's 5a            | 1 mg/ml          | 311                  | 325                  |
|            |                        | 5 mg/ml          | 304                  | 321                  |
| MDA-MB-468 | Leibovitz's L-15       | 1 mg/ml          | 311                  | 320                  |
|            |                        | 5 mg/ml          | 304                  | 312                  |
| A549       | DMEM                   | 1 mg/ml          | 256                  | 272                  |
|            |                        | 5 mg/ml          | 261                  | 267                  |
| BT474      | RPMI 1640              | 1 mg/ml          | 256                  | 300                  |
|            |                        | 5 mg/ml          | 261                  | 273                  |
| MCF7       | RPMI 1640              | 1 mg/ml          | 256                  | 280                  |
|            |                        | 5 mg/ml          | 256                  | 266                  |
| MDA-MB-435 | DMEM F12 Ham           | 1 mg/ml          | 256                  | 300                  |
|            |                        | 5 mg/ml          | 256                  | 269                  |

Tabelle 3.7 Einfluss des adsorbierten PTO auf die Partikelgröße, die Polydispersität, das Zetapotential in Gegenwart von MQ-Wasser und von Serum-enthaltenem Zellkulturmedium (DMEM F12 Ham); Inkubation von 100 µg PTO mit 1 mg NP+ für 1 h bei RT (n = 3)

|                               | Partikelgröße [nm] | Polydispersität | Zetapotential [mV] |
|-------------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| NP+                           | 203                | 0,02            | +39,0              |
| NP+ PTO                       | 245 ± 34           | 0,0263 ± 0,021  | -1,4 ± 8,0         |
| NP+<br>[Zellkulturmedium]     | 2842               | 1,000           | -15,4              |
| NP+ PTO<br>[Zellkulturmedium] | 802 ± 64           | 0,745 ± 0,222   | -22,3 ± 3,9        |

### **3.5.2 Zytotoxizitäts-Test**

Die Anwendung von Nanopartikeln als Arzneistoffträgersystem ist durch toxische Effekte, die 1.) durch das Material selber, 2.) von Abbauprodukten wie im Fall des bioerosiven Trägersystems PACA oder 3.) durch Zusätze zur Stabilisierung von Kolloiden oder zur Adsorption des ASO ausgelöst werden, nur eingeschränkt möglich. Die Eigentoxizität des Trägersystems wurde für die verschiedenen Partikelzubereitungen untersucht.

#### **3.5.2.1 Albumin-NP (HSA-NP)**

Die Zellzytotoxizität der HSA-NP in den beiden Brustkrebszell-Linien SK-Br-3 und MDA-MB-468 wurde nach einer Partikelinkubation über 144 h durch Auszählen der Zellen bestimmt. Für die beiden Zell-Linien MDA-MB-435 und A549 wurde ein Zeitraum von 96 h gewählt (siehe 2.6.3). Selbst die höchste eingesetzte Konzentration von 5 mg/ml HSA-NP mit einer Quervernetzung von 200% Glutaraldehyd hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität in SK-Br-3 (Abbildung 3.11) und A549-Zellen (Abbildung 3.12). Im Gegensatz zu allen anderen Partikelkonzentrationen und mit unterschiedlicher Quervernetzung führt eine Partikelkonzentration von 5 mg/ml (200% Glutaraldehyd) zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl in MDA-MB-468 (Abbildung 3.13) und MDA-MB-435-Zellen (Abbildung 3.14). Da die maximale Partikelkonzentration von 1 mg/ml für den Einsatz als ASO-Trägersystem ausreichend ist, werden keine zytotoxischen Effekte bei dieser Konzentration sogar bei stärkster Quervernetzung mit 200% Glutaraldehyd erwartet.

In Abbildung 3.12 und Abbildung 3.14 zeigen die Wachstumskurven einen zytostatischen Kurvenverlauf, der vermutlich aufgrund der Zelldichte in den Zellkulturschalen bedingt ist.



Abbildung 3.11: Zellzytotoxizität in SK-Br-3-Zellen: Inkubation mit Partikelkonzentrationen zwischen 0,1 und 5,0 mg/ml HSA-NP mit 200%iger Quervernetzung über eine Zeitdauer von 144 h

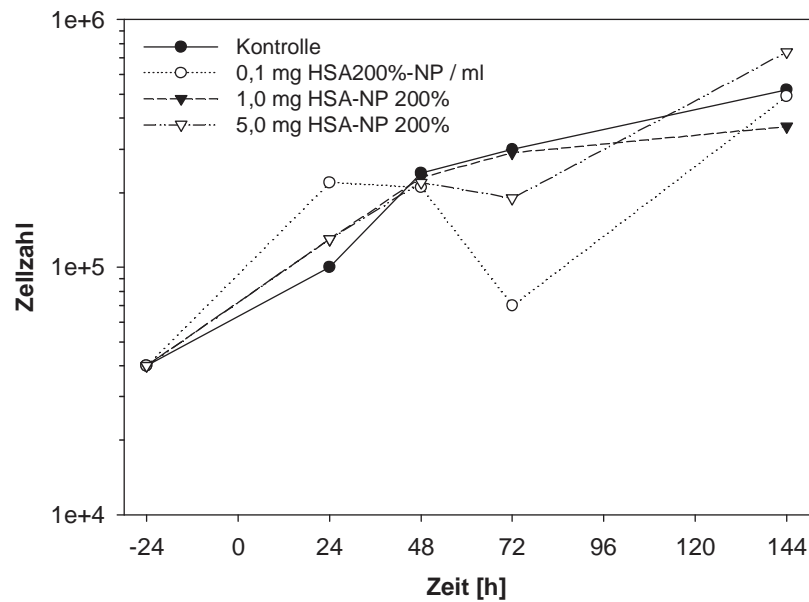


Abbildung 3.12: Zellzytotoxizität in A549-Zellen: Inkubation mit Partikelkonzentrationen zwischen 0,1 und 5,0 mg/ml HSA-NP mit 200%iger Quervernetzung über eine Zeitdauer von 96 h

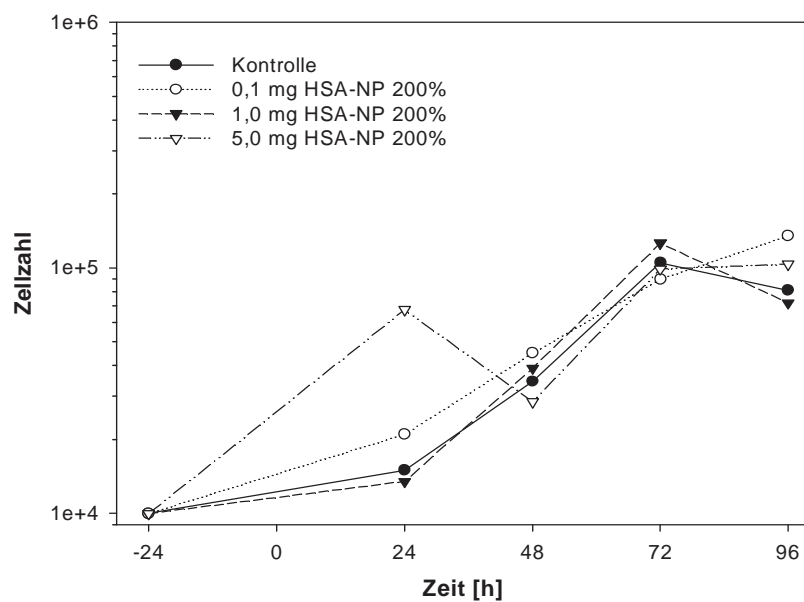


Abbildung 3.13: Zellzytotoxizität in MDA-MB-468-Zellen: Inkubation mit Partikelkonzentrationen zwischen 0,1 und 5,0 mg/ml HSA-NP mit 200%iger Quervernetzung über eine Zeitdauer von 144 h

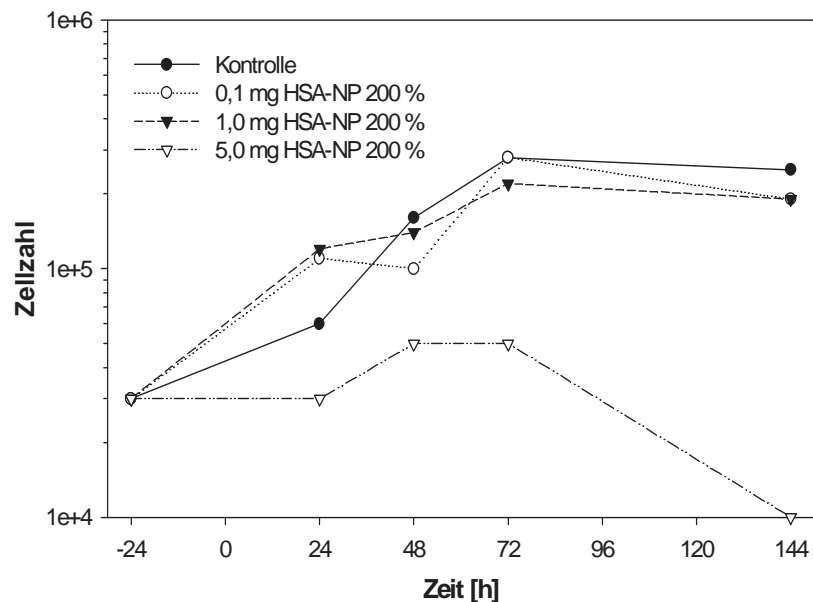
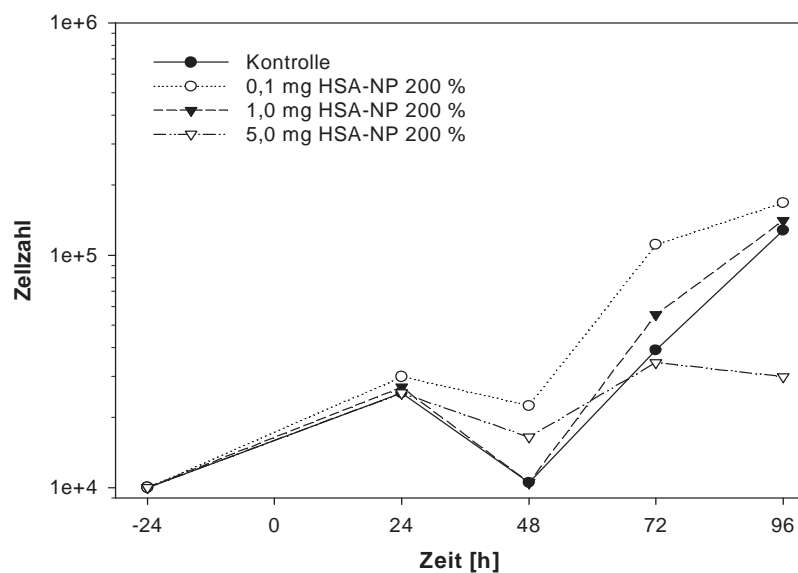


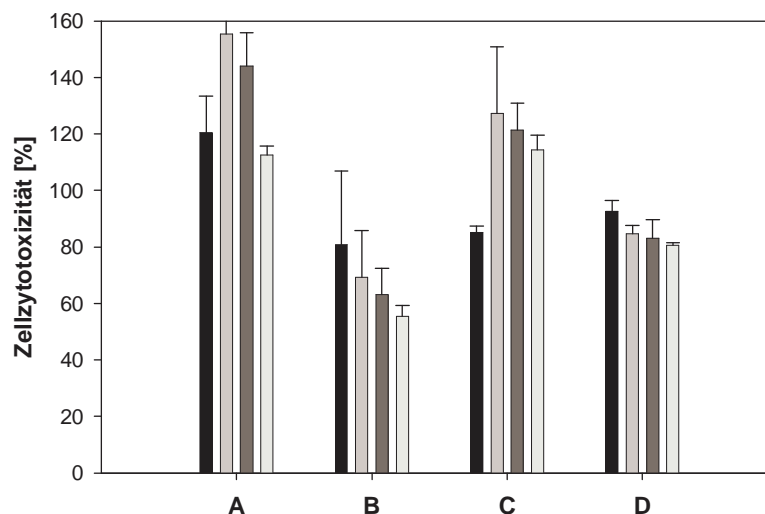
Abbildung 3.14: Zellzytotoxizität in MDA-MB-435-Zellen: Inkubation mit Partikelkonzentrationen zwischen 0,1 und 5,0 mg/ml HSA-NP mit 200%iger Quervernetzung über eine Zeitdauer von 96 h



### 3.5.2.2 Kationische HSA-NP (cHSA-NP)

Kationische HSA-NP (cHSA-NP), die mittels der herkömmlichen Desolvationsmethode einfach hergestellt werden konnten, ergaben Partikel mit guten Eigenschaften wie kleine Partikelgröße, enge Partikelgrößenverteilung, guter Partikelausbeute, einer ausreichenden Beladungseffizienz und Beladungskapazität. Aufgrund dieser Tatsachen sind cHSA-NP es wert, in der Zellkultur getestet zu werden.

Abbildung 3.15: Zellzytotoxizität von cHSA-Nanopartikel (cHSA-NP) so wie freiem cHSA in MDA-MB-435-Zellen nach 48 h: Inkubation mit **A** 19:1 cHSA-NP (250 µg, 500 µg, 1000 µg, und 2000 µg NP / ml) **B** 9:1 cHSA-NP (250 µg, 500 µg, 1000 µg, und 2000 µg NP / ml), **C** Oberflächen-kationisierte NP+ (16,3 µg, 32,6 µg, 65,4 µg, und 130,8 µg NP / ml), und **D** freiem cHSA (35,6 µg, 71,3 µg, 142,6 µg, und 285,2 µg cHSA / ml).



Zellzytotoxizitätsuntersuchungen wurden mit den verschiedenen Arzneistoff-trägersystemen sowie dem freien kationischen HSA (cHSA) in MDA-MB-435-Zellen durchgeführt. Da nun zahlreiche nanopartikuläre Zubereitungen vorlagen, wurde von der Methode der Zellzahlbestimmung Abstand genommen und mit dem LDH-Assay ausgewertet (siehe 2.8.5). Unbeladene 19:1 cHSA-NP, 9:1 cHSA-NP und NP+ wurden in verschiedenen Konzentration, die sich auf eine mögliche theoretische Beladung mit PTO beziehen, getestet (Abbildung 3.15). Um die Toxizität der Nanopartikel von der Toxizität des kationischen Polymers cHSA unterscheiden zu können, wurde auch das freie cHSA hinsichtlich seiner Eigentoxizität geprüft. Es wurde mit den 19:1 cHSA-NP und NP+ keine Toxizität beobachtet, dagegen zeigten

9:1 cHSA-NP eine hohe konzentrationsabhängige Toxizität. Die Zellviabilität nimmt bis auf 60% bei der höchsten eingesetzten Konzentration ab. Freies cHSA erscheint leicht toxisch (80%), jedoch führen hohe Konzentrationen an cHSA im Zellkulturmedium nicht zu einer weiteren Steigerung der Toxizität. Daher kann angenommen werden, dass die toxischen Effekte des cHSA einer unspezifischen Reaktion unterliegen.

Da 19:1 cHSA-NP keine akute Toxizität in Zellkulturversuchen aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass diese NP weniger mit der Zellmembran interagieren. Dadurch wird die Zelle weniger gereizt und die Toxizität stark vermindert.

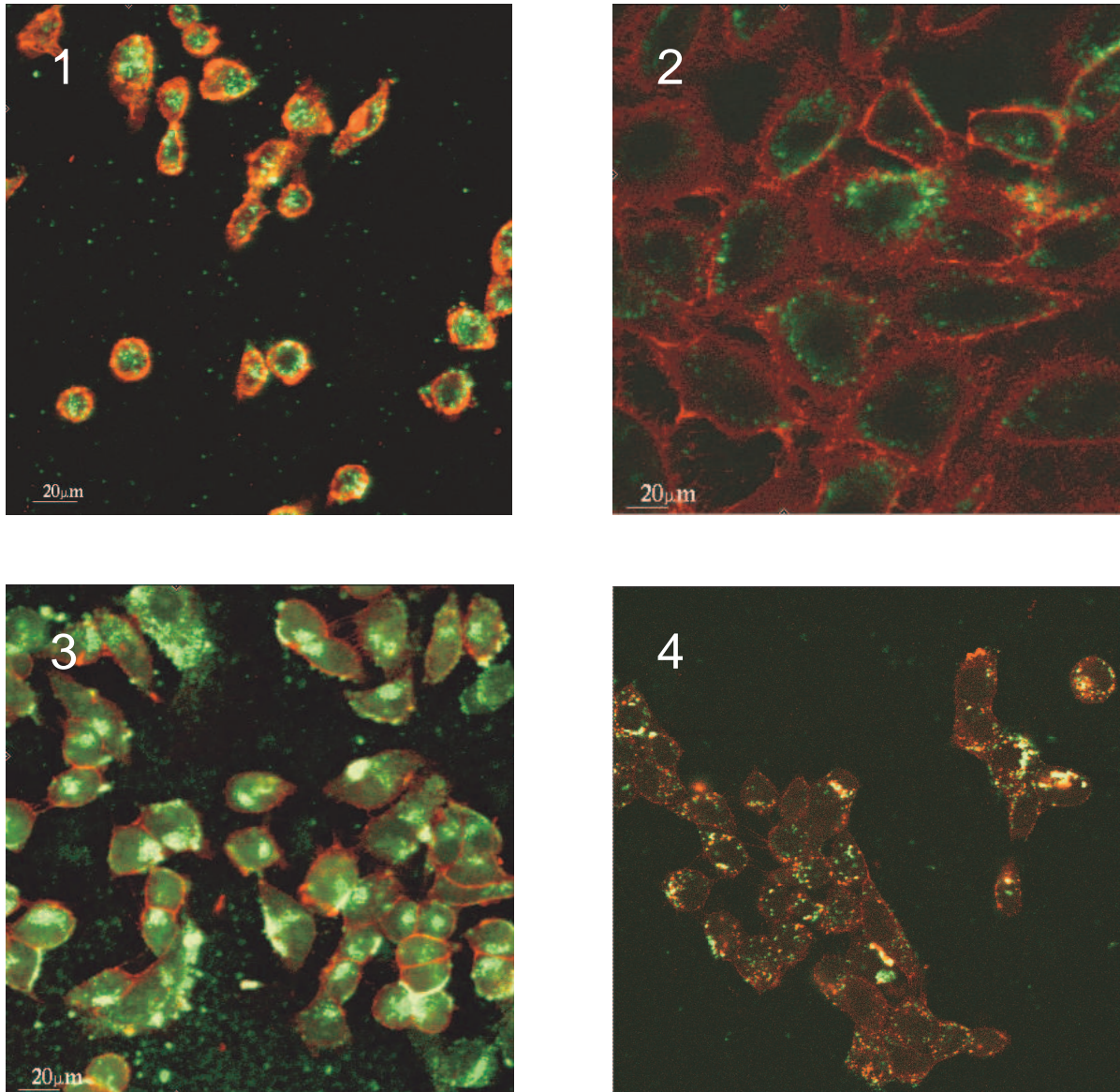
### **3.5.3 Zellaufnahme von HSA-NP und intrazelluläre Verteilung von ASO**

Viele Krebszell-Linien besitzen die Fähigkeit, kolloidale Partikel durch Endozytose zu internalisieren. Außer vom Zelltyp hängt das Ausmaß der Endozytose hauptsächlich von den Partikeleigenschaften ab, wie der Partikelgröße, der Oberflächenladung und der Hydrophobizität des Trägersystem. Daher wurden für die Zellaufnahmestudien verschiedene Krebszell-Linien hinsichtlich der Partikelaufnahme, der Arzneistoff-Freisetzung und der zellulären Verteilung des Arzneistoffes in der Zelle untersucht.

#### **3.5.3.1 Zellaufnahmestudien**

Zellaufnahmestudien mit unbeladenen Albumin-NP wurden im CLSM *in vitro* in verschiedenen Krebszell-Linien durchgeführt (siehe 2.6.5). Werden HSA-NP mit Glutaraldehyd quervernetzt, besitzen sie eine Autofluoreszenz, die bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden kann. Nach Anfärben der Zellmembran mit einem Fluoreszenzmarker Alexa594 ConA wurden die NP im CLSM detektiert.

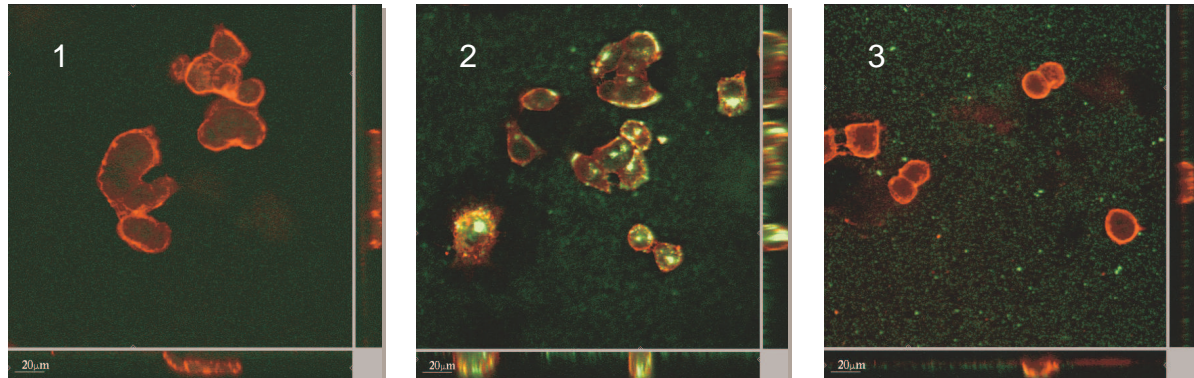
Abbildung 3.16: Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von HSA-Nanopartikeln: Autofluoreszierende HSA-Nanopartikel (grün) wurden in einer Konzentration von 0,4 mg/ml in 1.) MDA-MB 435, 2.) A549, 3.) MCF7, D.) BT474 für 24 h inkubiert und im CLSM detektiert. Die Zellmembran wurde mit Alexa<sup>TM</sup>594-Concanavalin A angefärbt (rot).



Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C waren in den meisten Zell-Linien NP-Punkte nach 24 h im lysosomalem Kompartiment der Zellen sichtbar (Abbildung 3.16). Die Zell-Linien unterschieden sich in ihrer Fähigkeit in Abhängigkeit der Zeit und Partikelkonzentration HSA-NP zu phagozytieren. In den meisten Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von 48 h hohe Konzentrationen an HSA-NP bei einer Partikelkonzentration von 1 mg/ml erreicht. Eine rasche Zellaufnahme wurde in den Brustkrebszell-Linien MCF7 und MDA-MB-435 erzielt. In diesen beiden Zell-Linien kam es schon nach 6 h zu einer merklichen Partikelanreicherung in den Zellen.



Abbildung 3.17: Zelluläre Aufnahme von unbeladenen HSA-Nanopartikeln: Autofluoreszierende HSA-Nanopartikel (grün) wurden in einer Konzentration von 1,0 mg/ml für 6 h in MCF7-Zellen inkubiert 1.) unbehandelte Zellen, 2.) HSA-NP bei 37°C 3.) HSA-NP bei 4°C und im CLSM detektiert. Die Zellmembran wurde mit Alexa<sup>TM</sup>594-Concanavalin A angefärbt (rot).

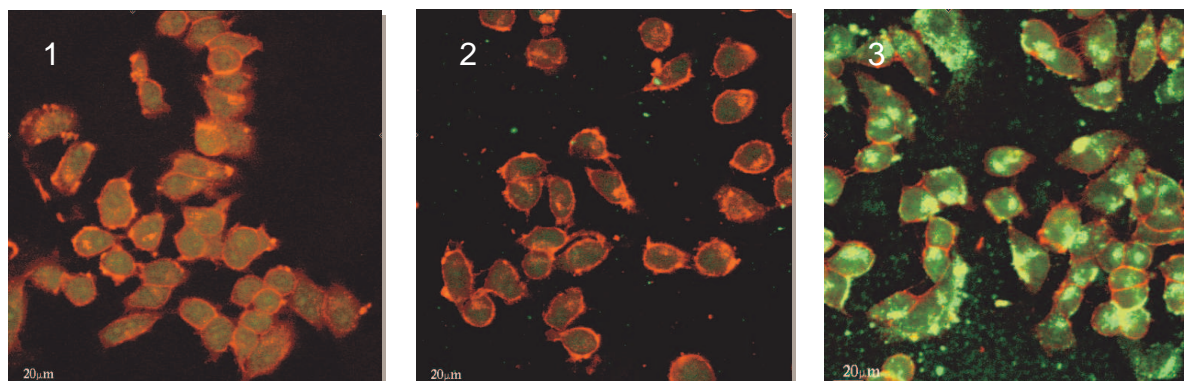


Um eine passive Diffusion von einer aktiven Zellaufnahme zu unterscheiden, wurden Zellaufnahmeexperimente bei 4°C und 37°C für 24 h mit 1,0 mg/ml HSA-NP (200%) durchgeführt. Bei 4°C konnte keine Partikelfluoreszenz in den Zellen detektiert werden (Abbildung 3.17). Partikel wurden nur in der Umgebung der Zelle gefunden. Bei 37°C reichert sich Partikel stark innerhalb der Zelle an. Daher wird ein Energie-abhängiger Aufnahmemechanismus basierend auf einer aktiven Endozytose postuliert.

### 3.5.3.2 Intrazelluläre Freisetzung von Cy5-ASO aus HSA-NP

In den vorangegangenen Zellaufnahmestudien mit HSA-NP, quervernetzt mit 40% oder 200% Glutaraldehyd, wurde eine rasche Nanopartikeldegradation nach zellulärer Aufnahme nur im Fall der 40% stabilisierten HSA-NP beobachtet. Dagegen konnten die 200% stabilisierten HSA-NP nach 24 h immer noch als Fluoreszenzpunkte in der Zelle detektiert werden (Abbildung 3.18). Im Gegensatz dazu trat bei 40% stabilisierten HSA-NP schon nach 1 h Partikelabbau ein. Daher wurde eine schnelle Arzneistoff-Freisetzung für diese Trägersysteme erwartet und diese HSA-NP wurden mit Fluoreszenz-markiertem PTO-beladen, um die intrazelluläre Arzneistoffverteilung zu untersuchen. Außerdem waren die in diesem Versuch eingesetzten HSA-Nanopartikel über 48 h in Zellkulturmedium stabil und zeigten keine Anzeichen einer Degradation (siehe 3.5.1.1). In Gegenwart von Enzymen, Trypsin oder Proteinase K, wurde die Degradationsgeschwindigkeit drastisch beschleunigt, was auf eine mögliche gute Freisetzung am Zielort in der Zelle hinweist (siehe 3.4.1.2).

Abbildung 3.18: Zelluläre Aufnahme von unbeladenen HSA-Nanopartikeln: Autofluoreszierende HSA-Nanopartikel (grün) wurden in einer Konzentration von 0,4 mg/ml für 24 h in MCF7-Zellen inkubiert 1.) unbeladene Zellen, 2.) HSA-NP mit 40%iger 3.) HSA-NP mit 200%iger Quervernetzung und im CLSM detektiert. Die Zellmembran wurde mit Alexa<sup>TM</sup>594-Concanavalin A angefärbt (rot).



Freisetzung und intrazelluläre Verteilung von HSA-NP beladen mit einem Fluoreszenz-markiertem Cy5-PTO wurden in den Zell-Linien A549, BT474, MCF7 und MDA-MB-435 durchgeführt (siehe 2.6.6). Die Zell-Linien A549, BT474, MCF7 und MDA-MB-435 wurden mit 1 µM Cy5-PTO-beladenen HSA-NP inkubiert (Tabelle 3.8). In Abhängigkeit der Beladungseffizienz der HSA-NP entspricht dies einer Partikelkonzentration zwischen 0,1 mg/ml und 0,5 mg/ml, um die geforderte PTO-Konzentration im Zellkulturmedium zu erhalten.

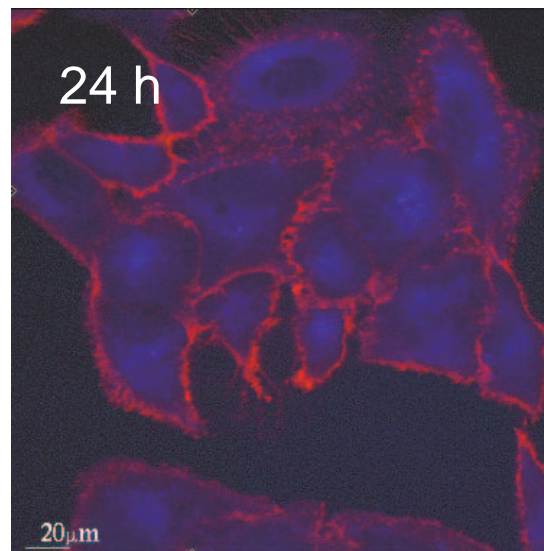
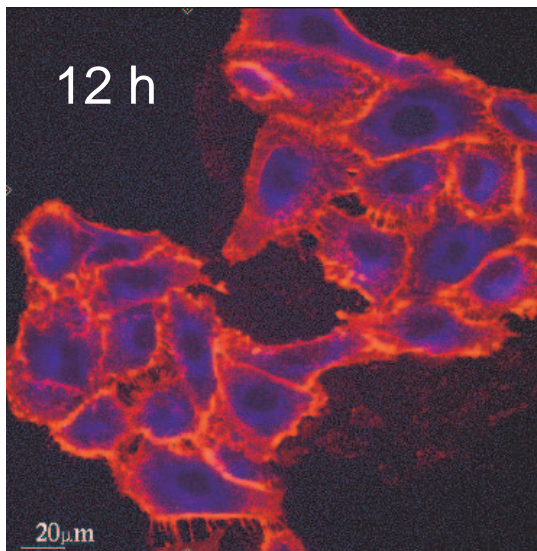
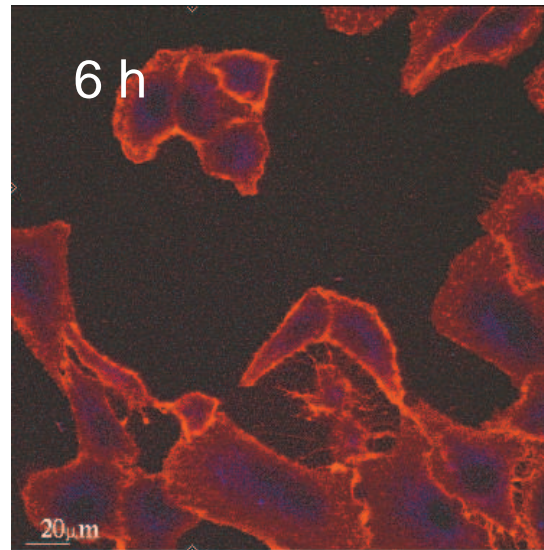
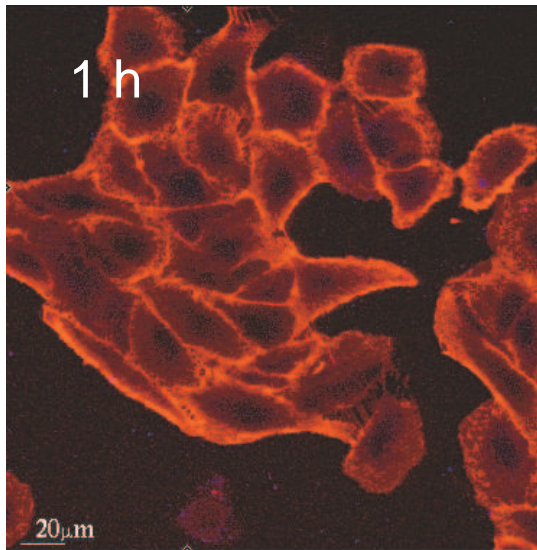
Tabelle 3.8: Zelluläre Anreicherung von freigesetzten Cy5-PTO aus HSA-Nanopartikeln mit 40% Quervernetzung in verschiedenen Krebszell-Linien über einen Zeitraum von 1 h bis 24 h. Die Menge an freigesetztem Cy5-PTO wurde im CLSM detektiert und wird durch folgende Symbole verdeutlicht: “-“ (keine Freisetzung detektierbar) und “++++” (hohe Freisetzung detektierbar).

| Zell-Linie | Inkubationszeit [h] |    |     |      |
|------------|---------------------|----|-----|------|
|            | 1                   | 6  | 12  | 24   |
| A549       | ++                  | +  | ++  | ++++ |
| BT474      | -                   | -  | ++  | +++  |
| MCF7       | +                   | ++ | +++ | ++++ |
| MDA-MB 435 | -                   | ++ | ++  | +++  |

Nanopartikel, die mit 200% Glutaraldehyd quervernetzt wurden, verblieben stabil innerhalb der Zelle, dagegen wurden HSA-NP mit einer 40%igen Quervernetzung sofort abgebaut, was eine zeitabhängige Freisetzung des Cy5-PTO innerhalb der

Zelle zur Folge hatte. Nach 24 h war das zytosolische Kompartiment der Zelle homogen mit dem blauen Cy5-PTO angefärbt (Abbildung 3.19).

Abbildung 3.19: Zeitabhängige zelluläre Aufnahme und Freisetzung des Cy5-PTO aus HSA-Nanopartikeln: Autofluoreszierende HSA-Nanopartikel (grün) wurden mit Cy5-PTO (blau) beladen, in einer Konzentration von 1  $\mu$ M PTO in A549-Zellen inkubiert und im CLSM nach Inkubationszeiten von 1 h, 6 h, 12 h und 24 h detektiert. Die Zellmembran wurde mit Alexa<sup>TM</sup>594-Concanavalin A angefärbt (rot).

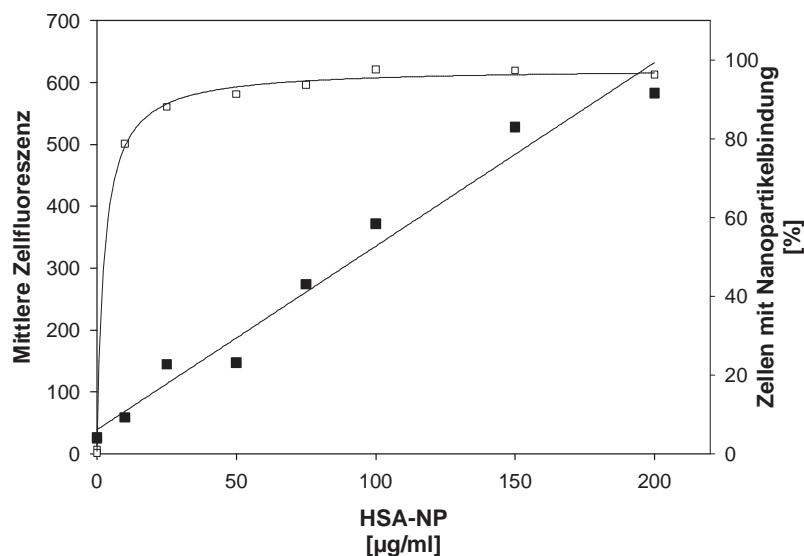




### 3.5.4 Sättigung der Partikelaufnahme

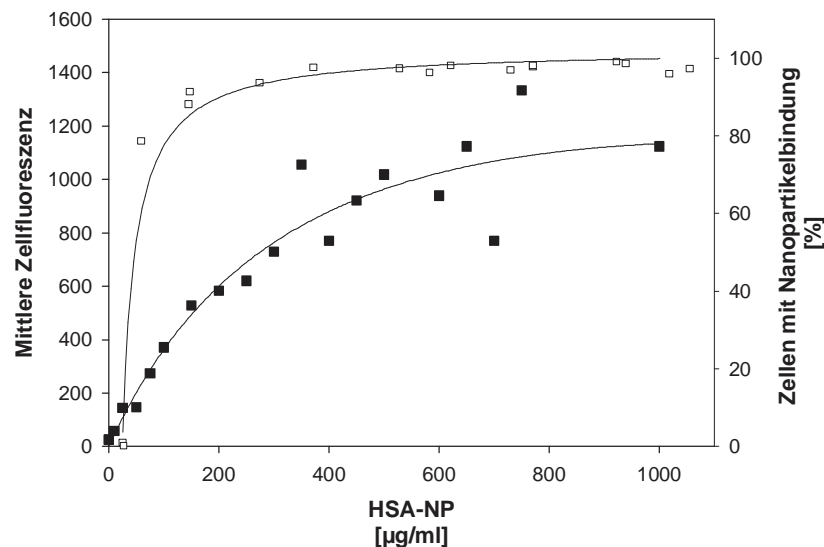
Der Einfluss der Partikelkonzentration im Bereich zwischen 10 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  auf die zelluläre Bindung von Albumin-NP in MDA-MB-435-Zellen wurde hinsichtlich folgender Parameter untersucht: 1.) Prozent an Zellen ( $\square$ ), die NP gebunden haben, und 2.) die mittlere Zellfluoreszenz ( $\blacksquare$ ) als Marker für die Quantität der NP pro individueller Zelle (siehe 2.6.7.2).

Abbildung 3.20: Einfluss der Partikelkonzentration im Bereich bis 200  $\mu\text{g/ml}$  HSA-NP auf die zelluläre Bindung von HSA-Nanopartikel: MDA-MB-435-Zellen wurden für 24 h mit HSA-NP inkubiert; ( $\blacksquare$ ) Mittlere Zellfluoreszenz ( $\square$ ) Prozent an Zellen, die eine Partikelbindung zeigen.



Wie der Abbildung 3.20 entnommen werden kann, zeigten bereits ab der niedrigsten Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  HSA-NP bis zu 85% der Zelle eine Assoziation mit NP. Die Kurve der HSA-NP erreicht ein Maximum bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ , das heißt von nahezu allen Zellen wurden ab dieser Konzentration HSA-NP aufgenommen ( $\square$ ). Im Gegensatz dazu nimmt die mittlere Zellfluoreszenz ( $\blacksquare$ ), die die Menge an Nanopartikeln pro Zelle darstellt, in diesem Bereich weiterhin zu. Die Partikelanreicherung verläuft bis zu einer Partikelkonzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  linear. Je mehr Partikel sich im Zellkulturmedium befinden, desto mehr können von den Zellen aufgenommen werden.

Abbildung 3.21: Sättigung der Partikelbindung im Bereich von 10 bis 1000  $\mu\text{g/ml}$ : MDA-MB-435-Zellen wurden für 24 h mit HSA-NP inkubiert; (■) Mittlere Zellfluoreszenz (□) Prozent an Zellen, die eine Partikelbindung zeigen.



In Abbildung 3.21 ist die Abhängigkeit der mittleren Zellfluoreszenz (■) von der Partikelkonzentration im Partikelkonzentrationsbereich bis zu 1000  $\mu\text{g/ml}$  aufgetragen. HSA-NP zeigten bei einer weiteren Konzentrationszunahme von über 200  $\mu\text{g/ml}$  nur eine leichte Verbesserung der Partikelakkumulation in Zellen. Die Zellen sind ab einer Partikelkonzentration von ungefähr 400  $\mu\text{g/ml}$  mit HSA-NP abgesättigt. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerungen zu, dass HSA-NP ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  an die meisten Zellen gebunden wurden und dass eine Zunahme der Partikelkonzentration den Vorteil erbringt, einen höheren Partikelgehalt pro Zelle zu erzielen. Jedoch wird eine Sättigung der Zellen mit HSA-NP ab einer Partikelkonzentration von ungefähr 400  $\mu\text{g/ml}$  erzielt. Ähnliche Ergebnisse wurden von Panyam et al. [2002] mit PLGA-NP erhalten. Die Aufnahme von NP erfolgt linear im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 100  $\mu\text{g/ml}$  NP, die Effektivität der Aufnahme ist bei höheren Konzentrationen verringert. Die Aufnahme erfolgt sehr rasch innerhalb der ersten beiden Stunden der Inkubation. Nach 4 bis 6 h erreicht die Partikelaufnahme eine Absättigung.

### 3.5.5 Fazit: Eignung als Trägersystem

Der Hauptaufnahmeweg der Nanopartikel in die Zelle ist die Endozytose. Dies konnte durch Zellaufnahmestudien mit unterschiedlichen Polymernanopartikeln belegt werden. Es konnte ein Energie-abhängiger Aufnahmemechanismus basierend auf einer Endozytose gezeigt werden [Wartlick et al., 2004b]. Im Allgemeinen werden

biomolekulare Komplexe rasch von frühen Endosomen zu späten Endosomen und schließlich zu Lysosomen, wo ein Abbau stattfindet, weitergeleitet [Mukherjee et al., 1997]. Nach intrazellulärer Aufnahme wird der Inhalt der Lysosomen abgebaut, sofern nicht spezielle Mechanismen bestehen, damit der Inhalt aus den Endolysosomen entkommt. Der Weg des internalisierten Komplexes ist gebunden an eine zunehmende saure Umgebung, welche durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe in den Membranen der endozytotischen Vesikel erzeugt wird und einhergeht mit dem Ablauf des Endozytosewegs. Diese Barriere zum zytoplasmatischen Eintritt stellt eine besondere Hürde für die Arzneistoffabgabe dar. Folglich ist dies der kritische Schritt bei der ASO-Abgabe, da das verwendete Trägersystem für die intrazelluläre Abgabe erfolgreich das ASO-Molekül vor Degradation in den Lysosomen schützen und das ASO in das zytoplasmatische Kompartiment liefern muss. Da der Zielort für ASO das Zytoplasma ist, ist es wichtig die Endolysosomen zu überwinden. Somit kann die therapeutische Wirksamkeit des ASO verbessert werden.

Die Aufnahme von HSA-NP in den untersuchten Zell-Linien hängt hauptsächlich von der Inkubationsdauer und der Nanopartikelkonzentration ab. CLSM wurde verwendet, um die Zellaufnahme von HSA-NP zu veranschaulichen. Optische Schnitte der Zelle deuten an, dass HSA-NP von den Zellen internalisiert werden, nicht an die Zelloberfläche gebunden werden, sondern sich in intrazellulären Kompartimenten akkumulieren. Die Aufnahme wächst mit zunehmender Zeit sowie der Partikelkonzentration an. Nach einer Inkubationszeit von 6 h war die Zellaufnahme deutlich im CLSM zu erkennen und nahm weiter innerhalb von 24 h zu. Obwohl der Mechanismus der Partikelaufnahme noch nicht geklärt ist, zeigten die Studien, dass die Partikelaufnahme vor allem von der Partikelgröße abhängt und Nanopartikel eine effizientere Aufnahme vorweisen als Mikropartikel [Desai et al., 1997]. Die Partikelaufnahme ist Energie-abhängig, da keine Aufnahme bei 4°C auftritt, hingegen eine hohe Aufnahme bei 37°C beobachtet wurde. Folglich kann von einer Partikelaufnahme durch Endozytose ausgegangen werden [Davda and Labhasetwar, 2002].

Die Arzneistoff-Freisetzung wurde nach Inkubationszeiten zwischen 1 h und 24 h untersucht. Schon innerhalb 1 h konnten mit Fluoreszenz-markiertem PTO-beladene HSA-NP, quervernetzt mit 40% Glutaraldehyd, in der Zelle freies Cy5-PTO detektiert werden, das heißt, dass ein Abbau der Partikelmatrix durch lysosomale Enzyme

stattfand. Das Cy5-PTO verteilte sich innerhalb der Zelle als diffuse Fluoreszenz. Das lässt vermuten, dass das Cy5-PTO im Zytoplasma der Zelle eher als in den Endosomen lokalisiert ist. Nur der Bereich des Zellkerns verblieb ungefärbt. Die Intensität des Cy5-Signals nahm über 24 h zu. Dagegen war es freiem ASO aufgrund des polyanionischen Rückgrates nicht möglich, die Zellmembran zu penetrieren. Im Vergleich von HSA-NP mit 40%iger und 200%iger Quervernetzung führte eine höhere Stabilisierung zwar zu einer stabileren Einbindung, jedoch keiner Freisetzung nach 24 h Inkubationsdauer.

### 3.6 Antikörper-vermittelte zelluläre Partikelaufnahme

Das Hauptproblem der meisten antitumoralen Wirkstoffe ist ihre extrem hohe Toxizität, die oftmals zu ernsthaften Nebenwirkungen führt. Um die unerwünschten Nebenwirkungen zu vermindern, wird im Allgemeinen versucht, ein Arzneistoff-trägersystem zu entwickeln, wie zum Beispiel Nanopartikel, die den Arzneistoff selektiver zu den Zielorganen oder Zelltypen liefern können. Ein erfolgreicher zielgerichteter Arzneistofftransport hat den Vorteil einer niedrigeren erforderlichen Dosierung, um ein therapeutisches Ansprechen zu erlangen, und dadurch können Nebenwirkungen durch eine niedrigere Belastung von Nicht-Zielgewebe mit antitumoralen Arzneistoffen reduziert werden.

Prinzipiell können Arzneistoffe direkt an Antikörper gebunden werden, ohne dass ein Polymer oder weitere Zusätze notwendig sind. Daher können Antikörper selber als Trägersysteme für Arzneistoffe eingesetzt werden. Nichtsdestoweniger muss das Problem angegangen werden, dass die Verknüpfung von einigen Arzneistoffmolekülen an Immunoglobulin im Verlust der Antikörperaktivität resultiert. Dieses Problem kann durch die Bildung von Konjugaten zwischen Antikörper und kolloidalem Trägersystem wie den Nanopartikeln umgangen werden. Sogar ohne Antikörpermodifikation zeigen diese Systeme eine bevorzugte Anreicherung in Tumorgeweben und können somit signifikant höhere Tumorspiegel als in normalem Gewebe erreichen. Dieses Phänomen ist auch bekannt unter dem Begriff "enhanced permeability and retention (EPR) effect" (siehe 1.2.2.3) [Maeda et al., 2000]. Diese Vorteile erzeugen ein gesteigertes Interesse an kolloidalen Trägersystemen.

Eine Kombination mit einem Antikörper stellt eine wertvolle neue Methode dar, die Spezifität zu steigern und den therapeutischen Effekt des Arzneistoffträgersystems weiter zu verbessern [Nielsen and Marks, 2000; Park et al., 2001; Waelti et al., 2002; Zhang et al., 2002]. Mittels Immunoliposomen konnten Tumorzellen spezifisch angesteuert werden, und der therapeutische Effekt der inkorporierten Zytostatika nahm zu, während zur gleichen Zeit die systemischen Nebenwirkungen des Arzneistoffes reduziert werden konnten [Ahmad et al., 1993; Baselga et al., 1998; Sugano et al., 2000]. Meistens wurden Immunoliposomen aufgrund ihrer relativ einfachen Herstellung und hohen Spezifität verwendet. Infolge ihrer kurzen Verweildauer im Blut werden Immunoliposomen hauptsächlich in Form von langzirkulierenden pegylierten Liposomen („Stealth-Liposomen“) eingesetzt.

In den vergangenen Jahren wuchs die Attraktivität von biodegradierbaren Nanopartikeln beträchtlich. Ihr Einsatz als potentielle Trägersysteme für eine kontrollierte Freisetzung, ihre Fähigkeit einer zielgerichteten Anreicherung in Organen bzw. Geweben, ihre Anwendung als Trägersysteme für DNA in der Gentherapie [Rhaese et al., 2003], und ihre Eigenschaft, Proteine, Peptide oder Gene zu transportieren [Soppimath et al., 2001] ist ein sehr vielversprechender Einsatz. Proteine wie Albumin und Gelatine sind besonders vorteilhaft als Ausgangsmaterialien, da die daraus resultierenden Nanopartikel biodegradierbar sowie relativ einfach in der Herstellung sind und ihre Partikelgrößenverteilung gut kontrolliert werden kann. In einer ersten Studie von Akasaka et al. [1988] mit Antikörper-modifizierten Albumin-Nanopartikeln wurde die Spezifität von freiem Antikörper für Tumorzellen deutlich nachgewiesen, hingegen verblieb die Tumorzellbindung nach Konjugation mit dem entsprechenden Antikörper an die Nanopartikel unklar.

### **3.6.1 Herstellung AK-modifizierter Partikelsysteme**

In vorangegangenen Arbeiten hat unsere Arbeitsgruppe Albumin- und Gelatine-Nanopartikel entwickelt, an die Arzneistoffe oder Liganden kovalent geknüpft werden können [Langer et al., 2000; Weber et al., 2000a; Weber et al., 2000b]. Eine neuer Ansatz ist hierbei, biotinylierte Liganden über die Ausbildung von Komplexen mit Avidinderivaten zu binden, die kovalent an die Partikeloberfläche gebunden werden. Dieses System wurde im Folgenden in Zellkulturversuchen getestet.

Auf der Basis von Gelatine und Albumin wurden Nanopartikel durch die bekannte Desolvationsmethode hergestellt. Abhängig vom Ausgangsmaterial wurden Nanopartikel im Größenbereich zwischen 211 und 318 nm erhalten. Die Partikeloberfläche wurde mit NeutrAvidin™ modifiziert. Die Funktionalität des Avidinderivates nach Konjugation an die Nanopartikel wurde überprüft und das erhaltene Trägersystem wurde verwendet, um den zellspezifischen Antikörper gegen das HER2 anzubringen. Auf dem Gebiet der Tumorthherapie hat sich HER2 als eine attraktive Zielstruktur für eine Antikörper-vermittelte zielgerichtete Therapie erwiesen, da 1.) die Überexpression des HER2-Proteins in hohem Ausmaß auf Krebszellen (insbesondere Brustkrebszellen) gefunden wird, 2.) die HER2-Überexpression mit einer schlechten Prognose verknüpft ist und 3.) im Wesentlichen eine größere Expression an HER2 auf Krebszellen als in normalen Gewebe [Press et al., 1990] ein selektives Targeting von malignen Zellen erlaubt. Die Verwendung von anti-HER2-

Antikörper für eine Zellerkennung ermöglicht die Konstruktion eines Arzneistoffträgersystems wie den Nanopartikeln, die für eine Anreicherung des Arzneistoffes im Zielgewebe befähigt sind. Dank dieser Vorteile konnten in den nachfolgenden Versuchen ein biotinylierter anti-HER2-Antikörper an die Nanopartikel durch die Ausbildung eines Avidin-Biotin-Komplexes gebunden werden. Durch Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass der Antikörper sehr effizient an die Partikel gebunden wurde. Modellberechnungen ergaben, dass ungefähr 370 Antikörpermoleküle an die Partikeloberfläche gekoppelt wurden. Gestützt auf der Idee, dass sogar eine begrenzte Anzahl an Liganden konjugiert an die Nanopartikel eine effektives und zellspezifisches Targeting ermöglichen sollten, wurden diese Nanopartikelzubereitungen unter Zellkulturbedingungen im Hinblick auf eine zellspezifische und Rezeptor-vermittelte Aufnahme getestet.

### 3.6.2 Zellkulturexperimente

#### 3.6.2.1 HER2-Proteinnachweis mittels Western Blot

Zunächst wurden für die nachfolgenden Bindungsstudien von anti-HER2-NP an Zellen verschiedene Zellmodellsysteme hinsichtlich ihrer HER2-Proteinexpressionslevel untersucht (siehe 2.7.4). Die Expressionslevel an HER2 in verschiedenen Brustkrebszell-Linien ist in Tabelle 3.9 dargestellt. Mittels Western Blot konnten hohe Konzentration an HER2-Protein in SK-Br-3 und BT474 nachgewiesen werden. MCF7 exprimiert nur mäßige Mengen an HER2, was in der Literatur als normale Konzentration an HER2 gilt [Lewis et al., 1993]. Basierend auf dieser Tatsache werden die HER2-Werte der MCF7-Zellen auf 100% gesetzt und die Expressionsmuster der anderen Zellen in Bezug auf die MCF7-Zellen berechnet.

Tabelle 3.9: HER2-Expressionlevel in verschiedenen Krebszell-Linien

| Zell-Linie | HER2-Expression [%] |
|------------|---------------------|
| BT474      | 310                 |
| MCF7       | 100                 |
| MDA-MB 435 | 0                   |
| SK-Br-3    | 370                 |

### 3.6.2.2 Zellspezifische Bindung von anti-HER2-Nanopartikeln

Um als Arzneistoffträgersystem effektiv zu sein, müssen anti-HER2-NP an Krebszellen spezifisch binden (siehe 2.7.5.1). Die Zielzellspezifität einer Antikörper-vermittelten zellulären Bindung von NP wurde untersucht und für Gelatine-NP in Abbildung 3.22 und für Albumin-NP in Abbildung 3.23 dargestellt. Verschiedene Zell-Linien, zwei mit einer hohen HER2-Expression auf der Zelloberfläche (SK-Br-3 und BT474), eine mit Normalexpression an HER2 (MCF7) und eine ohne HER2 Rezeptor, wurden auf ihre Fähigkeit, anti-HER2-NP nach 3 stündiger Inkubation bei 37°C zu binden, getestet. Die Bindungskapazität von anti-HER2-NP und unmodifizierten NP wurde mittels FACS analysiert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit beiden Arten von NP, Gelatine (Abbildung 3.22) bzw. Albumin (Abbildung 3.23), erhalten. Aufgrund der Dichte des HER2-Proteins auf der Zelloberfläche wurden für beide Polymerpartikelsysteme hohe Bindungen von anti-HER2-NP in SK-Br-3 (85%) beobachtet. Die Bindung von anti-HER2-NP aus Gelatine war nahezu ebenso effizient in BT474 (75%), jedoch weniger deutlich in MCF7-Zellen (60%). Im Fall der HSA-NP war die Zellbindung in BT474 leicht reduziert (60%) und keine Antikörper-vermittelte Akkumulation von Partikeln in MCF7-Zellen wurde beobachtet. Daraus folgt, dass die Bindung vom HER2-Gehalt abhängig ist.

Abbildung 3.22: Spezifität der Nanopartikelbindung an HER2-überexprimierende Zellen: Ergebnisse der FACS Analyse von BT474, MCF7, und SK-Br-3-Zellen; MDA-MB-435 dienten als HER2-Negativ-Kontrolle. Die Zellen wurden für 3 h mit 100 µg/ml Antikörper-modifizierten und unmodifizierten Gelatine-Nanopartikeln inkubiert (n = 4)

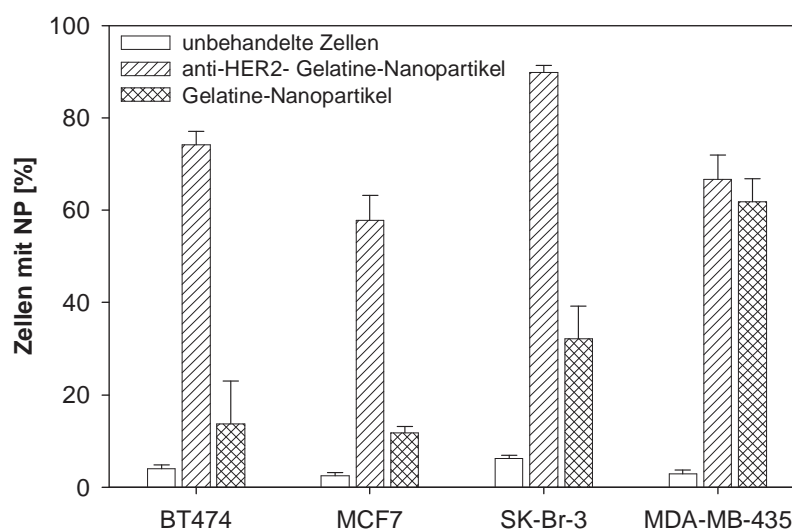
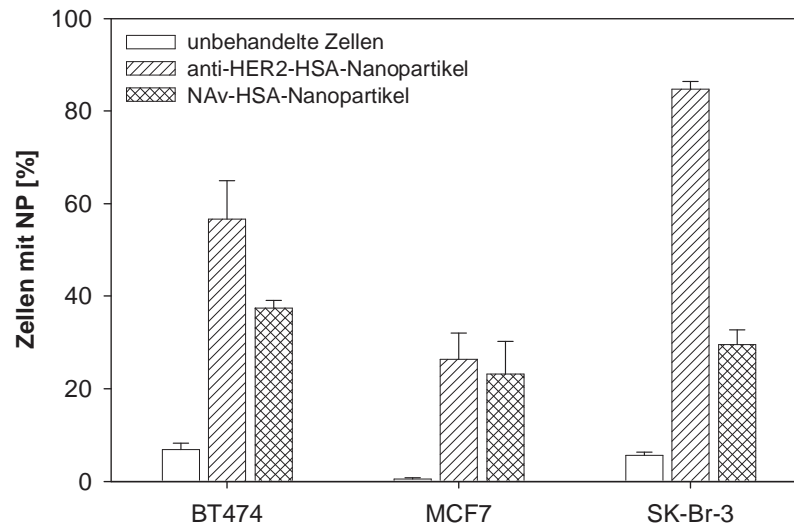


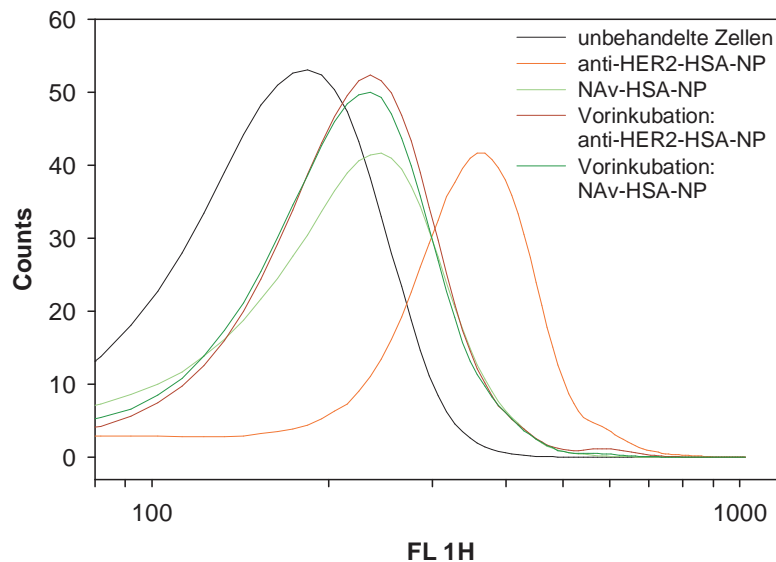


Abbildung 3.23: Spezifität der Nanopartikelbindung an HER2-überexprimierende Zellen: Ergebnisse der FACS Analyse von BT474, MCF7, und SK-Br-3-Zellen: Die Zellen wurden für 3 h mit 100 µg/ml Antikörper-modifizierten und unmodifizierten NAv-HSA-Nanopartikeln inkubiert (n = 4)



Kontrollnanopartikelzubereitungen mit NeutrAvidin™ (NAv) als Oberflächenmodifikation, jedoch ohne AK, zeigten vernachlässigbare Zellbindung in allen HER2 exprimierenden Zell-Linien. Die Level der nichtspezifischen Bindung von unmodifizierten NAv-NP schwankte stark innerhalb der getesteten Zell-Linien und scheint Zelltyp-abhängig. Allgemein lässt sich eine Tendenz zu unspezifischer Zellbindung bei Albumin-NP erkennen, und im Vergleich zu Gelatine-NP können hier leicht höhere Werte für unspezifische Effekte beobachtet werden. Unspezifische Bindung von Gelatine-NP ist recht niedrig, außer in SK-Br-3-Zellen, in denen die unspezifische Bindung bis zu 35% zunimmt. In der Kontrollzell-Linie MDA-MB-435 mit nicht detektierbaren HER2-Level wurden unspezifische Bindungen von NP beobachtet, was mit früheren Ergebnissen mit unmodifizierten HSA-NP übereinstimmt [Wartlick et al., 2004b].

Abbildung 3.24: Vergleich der zellulären Bindung von Antikörper-modifizierten und unmodifizierten NAv-HSA-Nanopartikeln (100 µg/ml) mit und ohne Vorinkubation mit Trastuzumab (2,5 µg/ml): Überlagerung von FACS-Analysen, Kurven wurden erhalten durch die Auswertung von  $10^4$  Zellen.



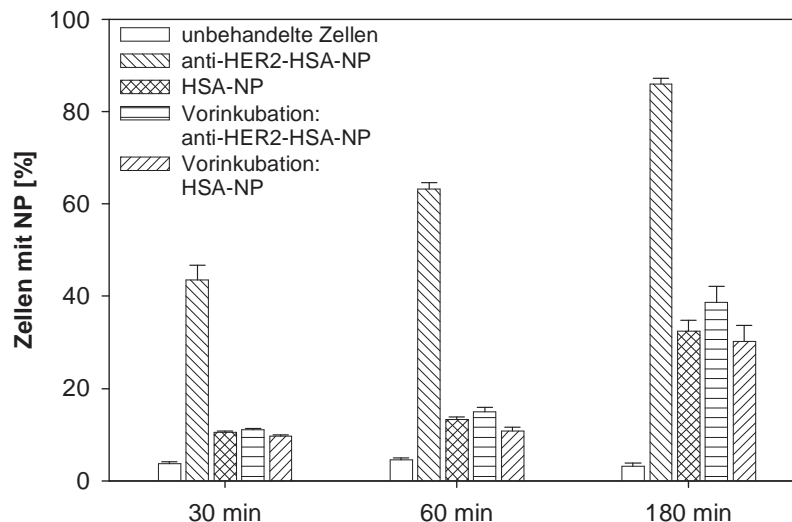
Die Spezifität der zellulären Bindung wurde weiterhin durch Inhibitionsversuche mit freiem Trastuzumab in SK-Br-3-Zellen untersucht. Zellen wurden mit Trastuzumab für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Partikelzubereitungen auf gleiche Weise behandelt wie in Kontrollexperimenten. Unter den Bedingungen einer Vorinkubation mit Trastuzumab konnten die Zellbindungsstellen erfolgreich geblockt werden und die Überlagerungsplots von anti-HER2-NP und unmodifizierten NAv-NP zeigten keinen Unterschied (Abbildung 3.24). Die zelluläre Bindung von anti-HER2-NP nach Vorinkubation mit Trastuzumab nahm in gleichem Ausmaß ab wie mit unmodifizierten NAv-NP. Daher kann von einer spezifischen und Rezeptor-vermittelten Aufnahme von anti-HER2-NP ausgegangen werden.

### 3.6.2.3 Zeitabhängigkeit der Partikelbindung

Die Kinetik der zellulären Bindung an Krebszellen mit HER2-Überexpression wurde in SK-Br-3-Zellen mit Albumin-NP untersucht (siehe 2.7.5.2). Die Werte der Bindung wurde gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abbildung 3.25). Innerhalb von 3 h akkumulieren sich sowohl anti-HER2-NP als auch unmodifizierte NAv-HSA-NP in Zellen. Da anti-HER2-NP Bindung an Zellen nach 3 h sich 85% annähert, scheint die Bindung eine Sättigung zu erlangen. In Versuchen mit Trastuzumab Vorinkubation konnte bestätigt werden, dass der freie AK die spezifische Bindung von anti-HER2-

NP verhindert, was für eine hauptsächlich spezifische Bindung der anti-HER2-NP spricht.

Abbildung 3.25: Zeitabhängigkeit der Partikelbindung an SK-Br-3-Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten (30, 60, and 180 min; n = 4). Die Zellen wurden mit 100 µg/ml HSA-Nanopartikeln inkubiert.



### 3.6.2.4 Einfluss der Partikelkonzentration auf die zelluläre Bindung

Der Einfluss der Partikelkonzentration im Bereich zwischen 5,0 und 100 µg/ml auf die zelluläre Bindung von Albumin-NP in SK-Br-3-Zellen wurde hinsichtlich folgender Parameter untersucht: 1.) die Effizienz der gezielten Zellanreicherung ausgedrückt als Anzahl der Zellen, die NP gebunden haben und 2.) die mittlere Zellfluoreszenz als Marker für die Quantität der NP pro individuelle Zelle (siehe 2.7.5.3).

Wie der Abbildung 3.26 entnommen werden kann, zeigten ab einer Konzentration von 50 µg/ml anti-HER2-NP bis zu 85% der Zelle eine Assoziation mit NP. Da die Kurve der anti-HER2-NP ein Maximum bei einer Konzentration von 50 µg/ml erreicht, verursacht eine Zunahme der Partikelkonzentration keine vermehrte Zellbindung. Im Gegensatz dazu zeigten unmodifizierte HSA-NP nur eine leichte unspezifische Zellbindung, die bei der höchsten eingesetzten Partikelkonzentration von 100 µg/ml immer noch linear verläuft.

Abbildung 3.26: Einfluss der Partikelkonzentration im Bereich von 5,0 bis 100  $\mu\text{g/ml}$  auf die zelluläre Bindung von HSA-Nanopartikel: SK-Br-3-Zellen wurden mit Antikörper-modifizierten und unmodifizierten HSA-Nanopartikel für 3 h inkubiert ( $n = 4$ ); Prozent an Zellen, die eine Partikelbindung zeigen.

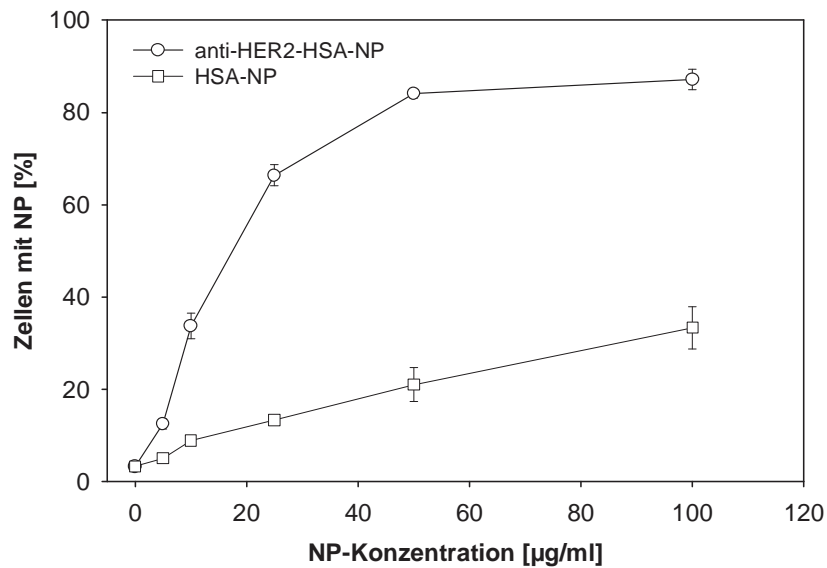
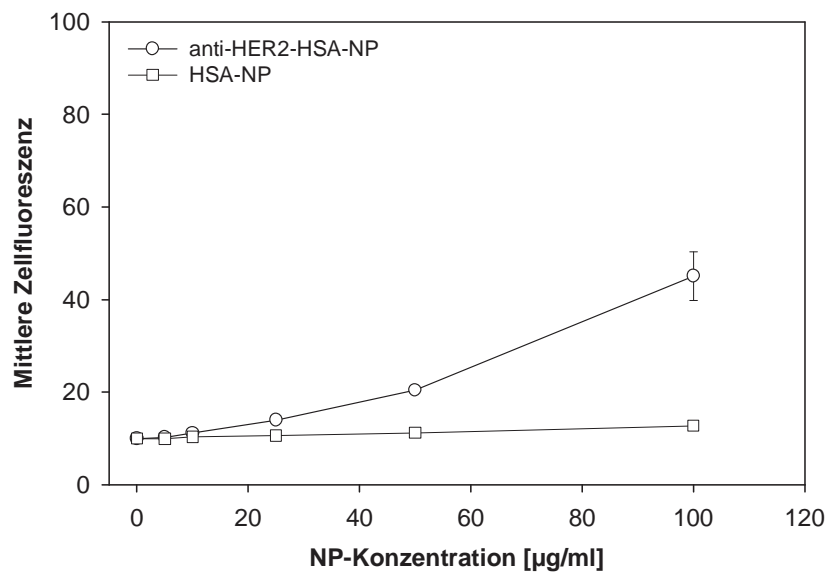


Abbildung 3.27: Einfluss der Partikelkonzentration im Bereich von 5,0 bis 100  $\mu\text{g/ml}$  auf die zelluläre Bindung von HSA-Nanopartikel: SK-Br-3-Zellen wurden mit Antikörper-modifizierten und unmodifizierten HSA-Nanopartikel für 3 h inkubiert ( $n = 4$ ); mittlere Zellfluoreszenz.



In Abbildung 3.27 ist die Abhängigkeit der mittleren Zellfluoreszenz von der Partikelkonzentration aufgetragen, die ein Maß für die Menge an Nanopartikel pro Zelle darstellt. Sowohl bei den anti-HER2-NP als auch bei den unmodifizierten HSA-NP steigen die Kurven linear über den beobachteten Partikelkonzentrationsbereich an. Daher wird angenommen, dass eine Sättigung der Zellen mit NP noch nicht erreicht wurde. Jedoch lässt der steile Verlauf der Kurve von anti-HER2-NP vermuten, dass ein höherer Partikelgehalt in den Zellen rascher erreicht wird als mit unmodifizierten HSA-NP. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerungen zu, dass anti-HER2-NP ab einer Konzentration von 50 µg/ml an die meisten Zellen gebunden wurden und dass eine Zunahme der Partikelkonzentration den Vorteil erbringt, einen höheren Partikelgehalt pro Zelle zu erzielen.

### **3.6.2.5 Untersuchung der Zellverteilung von AK-Nanopartikel mittels CLSM**

Damit ein geeignetes Arzneistoffträgersystem erhalten wird, müssen anti-HER2-NP nicht nur spezifisch an die Zelloberfläche binden, sondern auch eine aktive Endozytose in die Tumorzelle auslösen (siehe 2.7.6). Die zelluläre Internalisierung und die Verteilung von Gelatine und Albumin anti-HER2-NP wurde in SK-Br-3-Zellen mittels CLSM untersucht. Inkubation mit 100 µg/ml anti-HER2-Gelatine-NP über 3 h führte zu einer effizienten Aufnahme in die Zellen und konnte die Bindungsstudien bestätigen (Abbildung 3.28). Keine Fluoreszenzpunkte waren nach einer Vorinkubation mit freiem Trastuzumab und darauffolgender Partikelinkubation mit anti-HER2-NP detektierbar. Anti-HER2-Albumin-NP zeigten eine Bindung an die Zellmembran nach 1 h und intrazelluläre Fluoreszenz-Punkte konnten nach 3 h detektiert werden (Abbildung 3.29). In Übereinstimmung mit den vorhergegangenen Bindungsstudien konnten nach 3 h mehr Fluoreszenzpunkte von anti-HER2-NP gefunden werden. Auch weisen die CLSM-Untersuchungen auf eine Zeitabhängigkeit der Partikelaufnahme hin.

Abbildung 3.28: Zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von Gelatine-Nanopartikeln (grün) in SK-Br-3-Zellen (rot) im CLSM: Die Zellen wurden mit 100 µg/ml Nanopartikeln inkubiert: **A.** unmodifizierte NP, **B.** anti-HER2-NP ohne Vorinkubation, und **C.** anti-HER2-NP nach Vorinkubation mit Trastuzumab (2,5 g/ml).

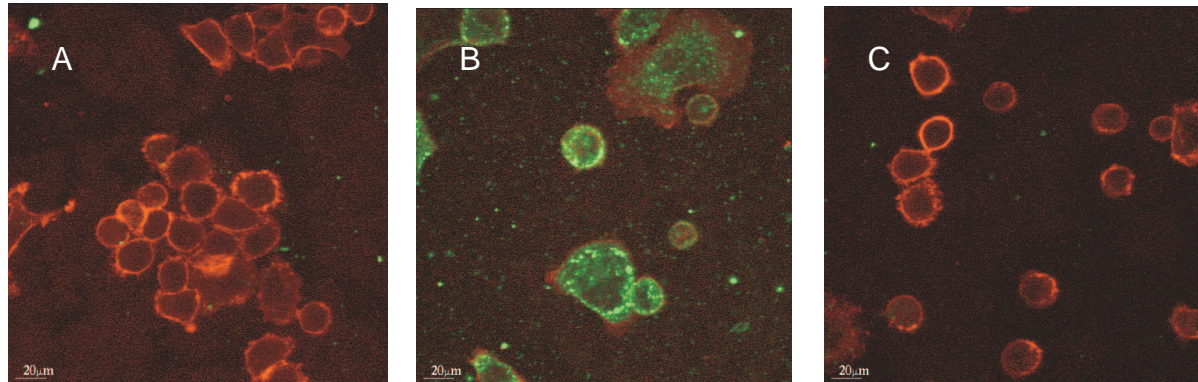
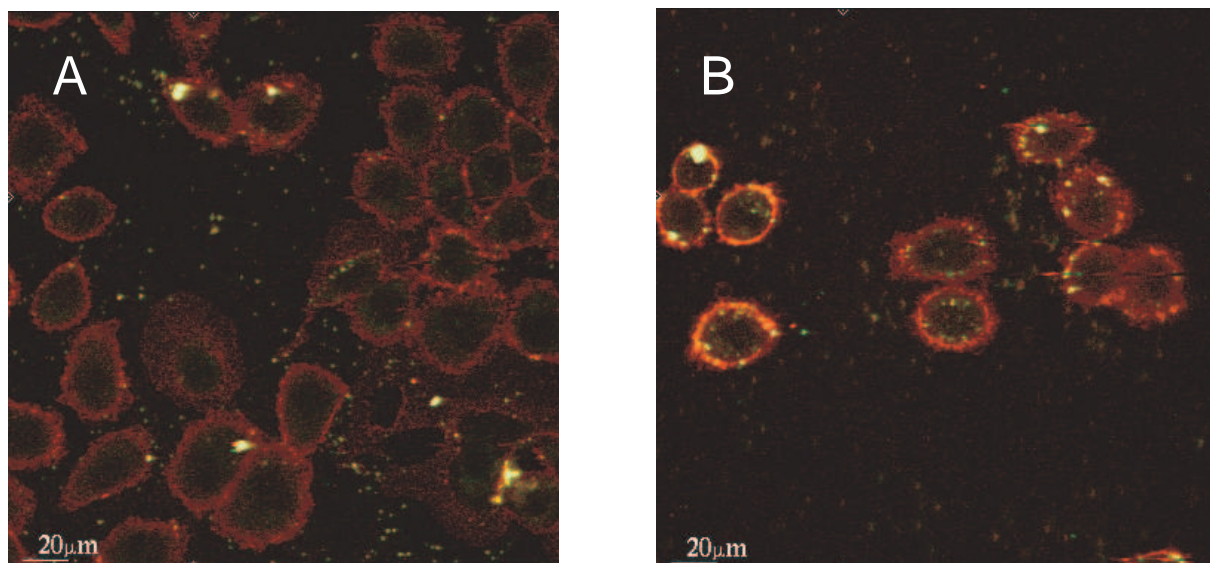


Abbildung 3.29: Intrazelluläres Verteilungsmuster von anti-HER2-NP (grün) in SK-Br-3-Zellen (rot) untersucht im CLSM nach **A.** 1 h, und **B.** 3 h Inkubationszeit. Die Zellen wurden mit 100 µg/ml Nanopartikel behandelt.



### 3.6.2.6 Intrazelluläre Freisetzung des Cy5-ASO aus anti-HER2-HSA-NP

Freisetzung und intrazelluläre Verteilung von anti-HER2-HSA-NP beladen mit einem Fluoreszenz-markierten Cy5-PTO wurden in SK-Br-3-Zellen durchgeführt (siehe 2.7.7). Nanopartikel wurden für dieses Experiment 40% quervernetzt, um einen Abbau der Partikelmatrix sowie die Freisetzung des Arzneistoffes zu ermöglichen. Die Zellen wurden mit Cy5-PTO-beladenen PEG-HSA-NP (Abbildung 3.30) oder anti-HER2-HSA-NP (Abbildung 3.31) entsprechend einer Cy5-PTO-Konzentration von 1 µM inkubiert.



Abbildung 3.30: Zeitabhängige zelluläre Aufnahme und Freisetzung des Cy5-PTO aus PEG-HSA-Nanopartikeln: Autofluoreszierende HSA-Nanopartikel (grün) wurden mit Cy5-PTO (blau) beladen, in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  PTO in SK-Br-3-Zellen inkubiert und im CLSM nach Inkubationszeiten von 1 h, 6 h, und 24 h detektiert. Die Zellmembran wurde mit Alexa<sup>TM</sup>594-Concanavalin A angefärbt (rot).

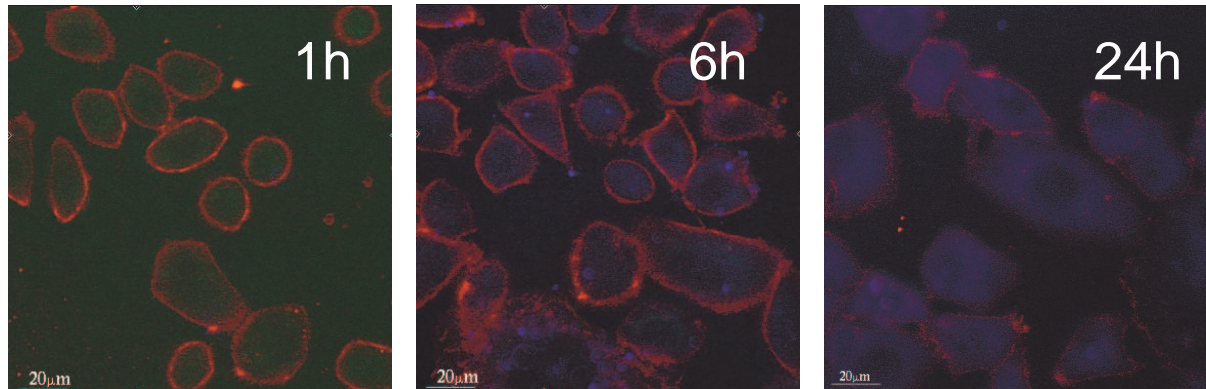
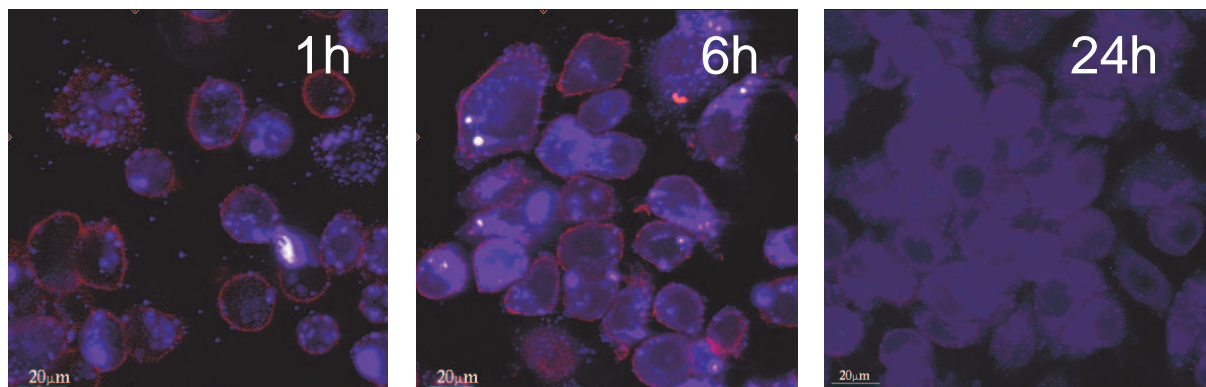


Abbildung 3.31: Zeitabhängige zelluläre Aufnahme und Freisetzung des Cy5-PTO aus anti-HER2-HSA-Nanopartikeln: Autofluoreszierende HSA-Nanopartikel (grün) wurden mit Cy5-PTO (blau) beladen, in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  PTO in SK-Br-3-Zellen inkubiert und im CLSM nach Inkubationszeiten von 1 h, 6 h, und 24 h detektiert. Die Zellmembran wurde mit Alexa<sup>TM</sup>594-Concanavalin A angefärbt (rot).



Beide Partikelsysteme setzten das Cy5-PTO in der Zelle frei. Die Anreicherung des Cy5-PTO nahm zeitabhängig zu. Nach 24 h war das zytosolische Kompartiment der Zelle homogen mit dem blauen Cy5-PTO angefärbt. PEG-HSA-NP wurden langsam und in geringem Ausmaß von den Zellen aufgenommen. Erst nach 6 h waren Fluoreszenzpunkte und eine leichte diffuse Blaufärbung zu erkennen, die nach 24 h deutlich zunahm. Dagegen wurden anti-HER2-HSA-NP rasch in die Zelle aufgenommen und schon nach einer Inkubationszeit von 1 h konnten Fluoreszenzpunkte in der Zelle beobachtet werden. Aufgrund der punktförmigen Verteilung der Fluoreszenz in der Zelle nach 1 h kann angenommen werden, dass der Wirkstoff zunächst in den Endolysosmen lokalisiert ist. Nach weiteren 5 h lagen

Fluoreszenzpunkte neben einer diffusen Blaufärbung des Zytosols vor. Eine Inkubationsdauer von 24 h erbrachte stark blaugefärbte Zellen. Die diffuse Blaufärbung des Zytosols weist dabei auf eine Freisetzung des Cy5-PTO aus der Partikelmatrix und den Endosomen hin.

### **3.6.3 Immunospezifische Nanopartikel**

Ob HER2-gerichtete kolloidale Arzneistoffträgersysteme das Innere der Zelle erreichen, ist abhängig von der HER2-Rezeptordichte auf der Zellen und von ihrer Rezeptorinternalisierung [Kirpotin et al., 1997]. Daher wurden Zell-Linien mit unterschiedlichen HER2-Expressionsleveln für die Evaluierung der Nanopartikelaufnahme verwendet. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Zellassoziation der Nanopartikel hauptsächlich von den HER2-Expressionsleveln beeinflusst wurde. Eine höhere Expression an HER2 führte zu einer verbesserten Partikelakkumulation. Im CLSM wurde gezeigt, dass die Nanopartikel nicht nur an die Zelloberfläche gebunden, sondern auch von den Zellen internalisiert wurden. Die Inhibitionsexperimente ließen erkennen, dass von einer Antikörper-vermittelten Endozytose ausgegangen werden kann. Internalisierende Epitope, wie HER2, können die intrazelluläre Arzneistoffkonzentration effizienter erhöhen, da der Eintritt des Arzneistoffes in die Zelle nicht alleine von einer passiven Diffusion abhängt. Rezeptor-vermittelte Endozytose ist ein unerlässlicher erster Schritt für viele Antikörper-gerichtete therapeutische Ansätze, wie Immunotoxine, Immunoliposomen, Antikörperkonjugate und Antikörper-gerichtete Gentherapie [Nielsen and Marks, 2000]. Folglich ist ein rationaler Weg, um ein System für eine wirksame Arzneistoffanreicherung auf nicht aggressive Weise in der Zelle zu entwickeln, die Vorteile dieser natürlichen Mechanismen zu nützen. In diesem Zusammenhang kommt die Frage auf, ob die vorgeschlagenen Protein-basierten Nanopartikel für eine effektive intrazelluläre Freisetzung von inkorporierten Arzneistoff verwendet werden können. Bisherige Studien veranschaulichten, dass Nanopartikel rasch nach Zellaufnahme abgebaut werden und dies zur einer signifikanten zellulären Akkumulation des eingeschlossenen Arzneistoffes in der Zelle führt [Wartlick et al., 2004b]. Diese Beobachtungen in Verbindung mit den hier erhaltenen Daten zeigen, dass die vorgeschlagenen Antikörper-modifizierten Nanopartikel ihr Versprechen für einen effektiven intrazellulären Arzneistofftransport halten können.



### 3.7 Nachweis des Antisense-Effektes

Zu den hervorstechenden Merkmalen von Tumorzellen gehört, dass sie sich unentwegt teilen. Dafür wird unter anderem das Enzym Polo-Like Kinase 1 (PLK1) in großen Mengen gebildet – ungleich mehr als in gesunden Zellen [Holtrich et al., 1994]. In den folgenden Versuchen gilt es, das Wachstum von Mammakarzinom-Zellen durch Hemmung der PLK-Funktion zu beeinflussen. Grundlage für die geplanten Hemmversuche ist die Verwendung von einem PLK-spezifischem Antisense-Oligonukleotid (P12), das in einer Arbeit von Spänkuch-Schmitt et al. *in vitro* und *in vivo* gute Effekte gezeigt hat [Spänkuch-Schmitt et al., 2002].

Die Hemmung der PLK1 mit einem spezifischem Antisense-Oligonukleotid (P12) bewirkt in letzter Instanz das Absterben der Tumorzellen. Ein einfacher Nachweis eines Antisense-Effektes lässt sich daher über eine Zellzahlbestimmung ermitteln. Detektionsmöglichkeiten, die zur Auswahl standen, waren die traditionelle Bestimmung der Zellzahl, der weit gebräuchliche MTT-Test und der sehr empfindliche LDH-Assay. Die letztgenannten Assays eignen sich gut für ein Screening, da eine Mehrfachbestimmung ebenso wie eine hohe Probenzahl gut durchführbar sind.

#### 3.7.1 Charakterisierung der verwendeten NP

Der erfolgreiche Einsatz von NP als Trägersystem für ASO hängt von vielen kritischen Faktoren ab, welche für einen späteren Einsatz in der Zellkultur und *in vivo* wichtig sind. Grundvoraussetzungen für eine gute Partikelqualität sind die stabile Beladung mit ASO und die Stabilität der Partikelmatrix in Zellkulturmedium, bevor sie in die Zelle eindringen.

Die Beladungskapazität der Oberflächen-kationisierten Nanopartikel (NP+) ist der Beladungskapazität von cHSA-NP und HSA-NP weit überlegen. Es ist nicht überraschend, dass es bei einfachen Adsorptionsexperimenten bei der Beladung mit ASO zu einer quantitativen Bindung kommt, da das ASO keinen komplexen Partikelherstellungsprozess durchläuft. Zwar haben die NP+ den Vorteil einer hohen Beladungskapazität (100 µg/mg NP+, siehe 3.4.3), unerfreulicherweise ist dies jedoch gekoppelt an den großen Nachteil der Partikelagglomeration im Zellkulturmedium infolge der kationischen Partikeloberfläche. Da die zelluläre Aufnahme größenabhängig ist und kleinere Partikel bevorzugt aufgenommen werden, kommt es eher nicht zu einer Anreicherung in der Zelle, sondern zu einer

Adhäsion an die Zellmembran. Letztendlich kristallisieren sich die besten Partikelformulierungen, basierend auf guten Effekten, in der Zellkultur heraus.

Die meisten Versuche wurden mit PTO-beladenen HSA-NP durchgeführt. In Tabelle 3.10 ist die Partikelcharakterisierung von mit ASO-beladenen HSA-NP dargestellt. Die unbeladenen HSA-NP haben eine durchschnittliche Partikelgröße von 490 nm. Die Partikelgröße schwankt sehr ( $\pm 320$  nm), da die Herstellung von leeren Nanopartikeln bei saurem pH zu einer Bildung von größeren Aggregaten neigt. Dagegen liegt die Partikelgröße von mit PTO-beladenen NP zwischen 222 und 250 nm und einer Standardabweichung von 49 nm. Alle NP besitzen ein Zetapotential von zwischen  $-14,6 \pm 9,3$  mV und  $-19,1 \pm 9,8$  mV. Die Partikel weisen stets eine negative Ladung auf. Die unbeladenen unterscheiden sich im Zetapotential nicht von den PTO-beladenen NP, was darauf hinweist, dass das PTO in die Partikel eingebunden ist und sich nicht adsorptiv an der Oberfläche befindet. Die Partikelausbeute liegt zwischen 75,3 und 83,7%.

Tabelle 3.10: Charakterisierung von mit ASO-beladenen HSA-NP (n = 10); P12: Antisense-Sequenz, P12scr: Scrambled-Sequenz, HSV: Random-Sequenz

| Proben           | Partikelgröße [nm] | Zetapotential [mV] | Partikel-ausbeute [%] | Beladungs-effizienz [%] | Beladungs-kapazität [ $\mu$ g PTO / mg NP] |
|------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|--|
| <b>HSA-NP</b>    | 490 $\pm$ 320      | -14,8 $\pm$ 12,1   | 75,3 $\pm$ 20,2       | -                       | -  |
| <b>P12-NP</b>    | 237 $\pm$ 40       | -19,1 $\pm$ 9,8    | 82,2 $\pm$ 9,3        | 36,9 $\pm$ 13,5         | 6,8 $\pm$ 2,5                              |
| <b>P12scr-NP</b> | 222 $\pm$ 49       | -16,2 $\pm$ 8,2    | 80,0 $\pm$ 13,7       | 35,2 $\pm$ 22,1         | 6,6 $\pm$ 4,5                              |
| <b>HSV-NP</b>    | 250 $\pm$ 40       | -14,6 $\pm$ 9,3    | 83,7 $\pm$ 10,9       | 51,7 $\pm$ 32,6         | 9,4 $\pm$ 6,0                              |

Eine alleinige Bestimmung der Beladungseffizienz aus den Partikelüberständen ist weniger sinnvoll, da sie stark von den erhaltenen Werten nach dem Partikelabbau abweicht. Daher wurde die Ladungseffizienz stets nach dem Partikelabbau bestimmt. Die mit P12 beladenen NP haben eine Beladungseffizienz von  $36,9 \pm 13,5\%$ , die mit P12scr beladenen NP von  $35,2 \pm 22,1\%$ , und HSV-NP von  $51,7 \pm 32,6\%$ . Die Herstellung von mit ASO-beladenen NP ist gut reproduzierbar. Wird in der Zellkultur mit einer  $1 \mu$ M ASO-NP-Suspension inkubiert, entspricht dies ungefähr einer Partikelkonzentration von  $1000 \mu$ g/ml. In vorangegangenen Zellzytotoxizitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Partikelkonzentration von den Zellen gut vertragen wird (siehe 3.5.2).

### 3.7.2 Wirkung von mit ASO-beladener HSA-NP

Von den untersuchten Krebszell-Linien wurde zunächst aufgrund guter Partikelaufnahme und intensiver Freisetzung des Cy5-PTO auf die MDA-MB-435-Zell-Linie fokussiert (siehe Tabelle 3.11). Nach erfolglosen Versuchen wurden die Partikelzubereitungen im Anschluss in allen weiteren Zell-Linien getestet (siehe Tabelle 3.12). Die Partikelzubereitungen entsprachen PTO-Konzentrationen im Bereich von 250 nM bis 2  $\mu$ M. In allen Tests wurden die entsprechenden Kontrollzubereitungen mit der Scrambled-Sequenz und der Random-Sequenz mitgeführt. Als Positivkontrolle diente eine Transfektion von P12 mit Hilfe von DOTAP. Problematisch war hierbei, dass DOTAP eine starke Eigentoxizität aufweist und so nicht bei allen Versuchen der Antisense-Effekt besonders gut hervorgehoben werden konnte. Außerdem kommt es durch einen hohen G/C-Anteil in der Antisense- wie auch in der Scrambled-Sequenz zu Sequenz-unspezifischer Wirkung (siehe 1.3.1.2).

Vielversprechende Ergebnisse blieben aus. Eigentlich sollte davon ausgegangen werden, dass ein ASO-Effekt innerhalb der ersten 72 h nach Inkubation mit den Partikelzubereitungen auftritt. Die NP wurden über 24 h effizient von den Zellen aufgenommen, gefolgt von einer guten raschen Freisetzung des ASO. Das bedeutet, dass ein ASO-Effekt auf mRNA-Ebene nach weiteren 24 h (= 48 h nach Partikelinkubation), und auf Proteinebenen nach 72 h erwartet werden könnte. Die Zellzahlbestimmung sowie der MTT-Test und LDH-Assay erbrachten in MDA-MB-435 mit den P12 beladenen HSA-NP während eines Zeitraumes von 96 h keine Abnahme der Zellzahl. Es wurde anhand eines Northern Blotes versucht, auf mRNA-Ebene leichte Veränderungen zu detektieren. Es war kein Antisense-Effekt nachweisbar.

Tabelle 3.11: Nachweis des Antisense-Effektes von dem 20mer Phosphorothioat P12 gerichtet gegen die 3'-untranslatierte Domäne der PLK1 mRNA in MDA-MB-435: eingesetzte Partikelkonzentrationen lagen im Bereich, die einem Gehalt von 250 nM, 500 nM, 1 µM und 2 µM an PTO entsprachen; nn = Antisense-Effekt der Partikelsysteme war nicht nachweisbar (n = 3)

| Zell-Linie | Zellkulturparameter           |                              |                                    |               | Antisense-Effekt |
|------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------|------------------|
|            | Inkubationszeit [h]           | Zusatz von 100 µM Chloroquin | Partikelsystem                     | Assay         |                  |
| MDA-MB-435 | 24, 48, 72, 96, 120           | -                            | HSA-NP                             | Zellzahl      | nn               |
|            | 24, 48, 72, 108               | -                            | HSA-NP                             | Northern Blot | nn               |
|            | 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 | -                            | HSA-NP                             | LDH           | nn               |
|            | 24, 48, 72                    | -                            | 19:1 cHSA-NP<br>9:1 cHSA-NP<br>NP+ | LDH und MTT   | möglich          |
|            |                               |                              | 2% ige cHSA-Lösung                 |               |                  |
|            | 24, 48, 72                    | +                            | 19:1 cHSA-NP<br>9:1 cHSA-NP<br>NP+ | LDH und MTT   | nn               |

Die Einbindung des ASO in die Nanopartikel konnte durch die Zugabe von kationischem HSA (cHSA) bei der Partikelherstellung verbessert werden (siehe 3.2). Der Zusatz von cHSA führte zu einer weiteren Verbesserung der Beladungseffizienz und Beladungsstabilität. Die Partikel konnten in niedrigeren Partikel-Konzentrationen trotz gleichbleibender PTO-Menge eingesetzt werden. Das bedeutet, dass pro aufgenommenem Partikel in die Zelle mehr ASO vorhanden ist. Da nur eine beschränkte Menge an Partikel von Zellen aufgenommen werden können (siehe 3.5.4), stellt dies einen entscheidenden Vorteil dar. Die Fortschritte der Partikeloptimierung wurden auf die Zellkulturexperimente übertragen. Im Hinblick auf einen Antisense-Effekt konnte jedoch keine Verbesserung festgestellt werden. Bedauerlicherweise blieb ein Antisense-Effekt aus.

Tabelle 3.12: Nachweis des Antisense-Effektes in den Zell-Linien A549, BT474 und MCF7: eingesetzte Partikelkonzentrationen lagen im Bereich, die einem Gehalt von 250 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M und 2  $\mu$ M an PTO entsprachen; nn = Antisense-Effekt der Partikelsysteme war nicht nachweisbar (n = 3)

| Zell-Linie | Zellkulturparameter   |                                   |                    |             | Antisense-Effekt |
|------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------|-------------|------------------|
|            | Inkubationszeit [h]   | Zusatz von 100 $\mu$ M Chloroquin | Partikelsystem     | Assay       |                  |
| A549       | 24, 48, 72            | -                                 | 19:1 cHSA-NP       | LDH         | nn               |
|            |                       |                                   | 9:1 cHSA-NP        |             |                  |
|            | 24, 48, 72            | +                                 | NP+                | LDH und MTT | nn               |
|            |                       |                                   | 2% ige cHSA-Lösung |             |                  |
| BT474      | 72, 96, 120, 144, 168 | -                                 | HSA-NP             | LDH         | nn               |
|            | 24, 48, 72            | +                                 | NP+                | LDH         | nn               |
| MCF7       | 24, 48, 72, 96, 120   | -                                 | HSA-NP             | Zellzahl    | nn               |
|            | 72, 96, 120           | -                                 | HSA-NP             | LDH         | nn               |
|            | 24, 48, 72            | +                                 | NP+                | LDH         | nn               |

Leider konnte auch in allen weiteren untersuchten Zell-Linien kein Antisense-Effekt nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.12).

Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben eines Antisense-Effektes, trotz detektierter Freisetzung eines Cy5-markierten PTO in das Zytosol der Zelle, könnte durch die Abspaltung der Farbmarkierung und deren Freisetzung in das Zytosol zustande gekommen sein. Eine Freisetzung des Cy5-PTO in das Zytosol würde dann vorgetäuscht. Um dem PTO ein Entkommen aus den Endolysosomen zu ermöglichen, wurde auf eine Inkubation mit Chloroquin zurückgegriffen. Ein Zusatz von Chloroquin ist bekannt die Endosomenmembran zu destabilisieren und die Freisetzung aus den Endosomen zu erleichtern. Dies erscheint jedoch nicht sinnvoll, da es nicht auf eine spätere Anwendung *in vivo* übertragen werden kann. Einige

Versuche wurden unternommen, die keinerlei Anzeichen einer Verbesserung mit sich brachten.

In den Studien von Arnedo et al. wurde vergeblich versucht, die Albumin-Nanopartikel als neues Trägersystem in der ASO-Therapie zu etablieren [Arnedo et al., 2002; Arnedo et al., 2003; Arnedo et al., 2004]. Arnedo et al. kommen zu der Schlussfolgerung, dass mit Albumin-NP zwar eine Verbesserung des pharmakokinetischen Profils erreicht, aber durch die Gabe von NP die eingesetzte PTO-Konzentration nicht reduziert werden kann. Es wurde erst ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  ein Antisense-Effekt sichtbar, sodass die Einbindung von PTO in NP im Vergleich zu freiem PTO keine Verbesserung der antiviralen Effektivität erbrachte. Nanopartikel, bei denen das ASO eingebunden in der Matrix vorlag, zeigten einen besseren Effekt im viralen Assay als Partikel, die ASO an der Oberfläche adsorbiert hatten.

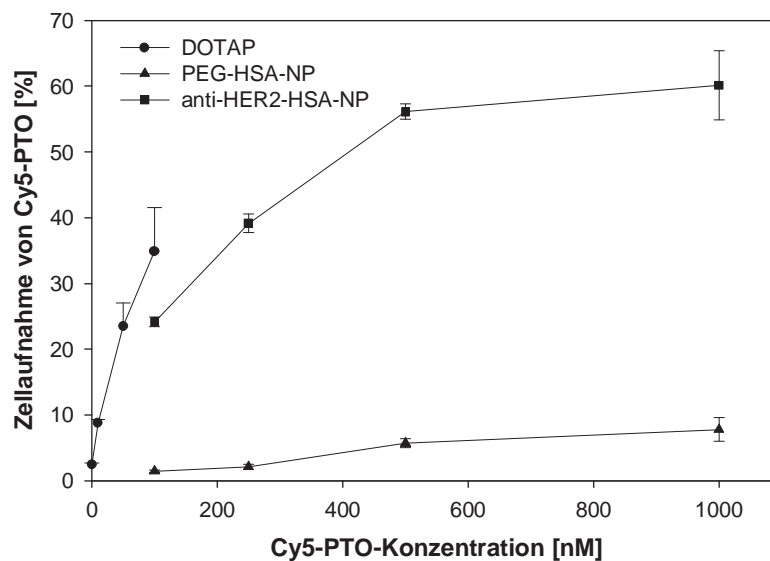
Da vermutet wird, dass Albumin aufgrund seiner fusogenen Eigenschaften [Sato et al., 1999] einen Einfluss auf die Zellaufnahme des ASO und intrazelluläre Verteilung hat, wurde in einer Studie von Arnedo et al. die Fähigkeit von Albumin als Transfektionsbeschleuniger untersucht. Die Komplexierung von ODN mit Albumin verbesserte die Stabilität gegenüber Nukleasen nicht, jedoch konnte die intrazelluläre Verteilung des ODNs zugunsten des Zellkerns verändert werden [Arnedo et al., 2003]. Dieser Effekt wurde erst bei hohen Konzentrationen an Albumin beobachtet. Die notwendige ODN-Konzentration in einem viralen Assay lag bei 10  $\mu\text{M}$ . Dabei war bei ODN-Albumin-Komplexen der Antisense-Effekt ausgeprägter als bei der freien ODN-Lösung.

### **3.7.3 Quantifizierung der Transfektionseffizienz von SK-Br-3-Zellen mittels FACS**

Eine weitere Erklärung für den Widerspruch der beobachteten Freisetzung eines Cy5-PTO in das Zytosol der Zelle und dem nicht nachzuweisbarem Antisense-Effekt ist möglicherweise, dass zu wenig ASO-Moleküle in die Zelle gelangen. In den CLSM-Untersuchungen konnte keine quantitative Aussage bezüglich des Cy5-PTO-Gehaltes in der Zelle getroffen werden (siehe 3.6.2.6). Mittels FACS-Analyse lässt sich ein Vergleich der Konzentration anstellen, die mit Cy5-PTO/DOTAP erreicht wird, zu den Konzentrationen, die mit den eingesetzten Partikelsystemen erreicht werden können. Da in den CLSM-Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass sich

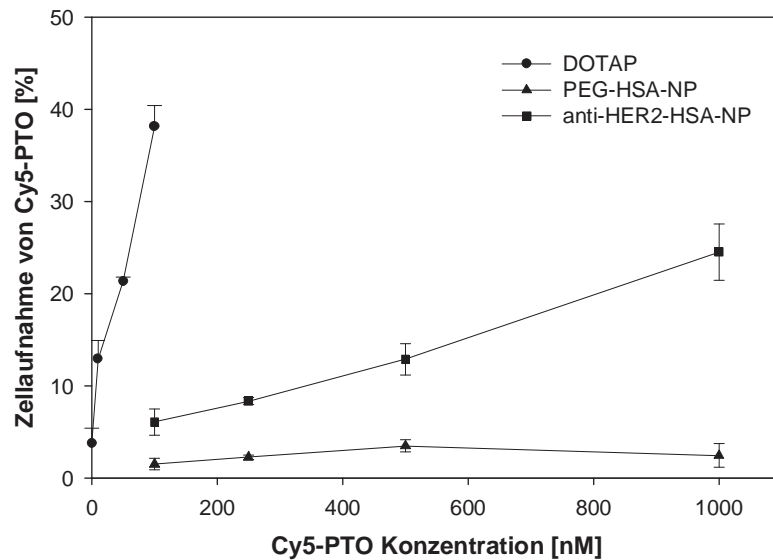
das aus den NP freigesetzte Cy5-PTO in der Zelle befindet, kann anhand der FACS-Ergebnisse ein relativer intrazellulärer Cy5-PTO-Gehalt geschätzt werden.

Abbildung 3.32: Quantifizierung der Transfektionseffizienz: Cy5-PTO an oder in SK-Br-3-Zellen, Inkubation über 6 h mit Cy5-PTO/DOTAP (●) in einem Cy5-PTO-Konzentrationsbereich von 0 bis 100 nM, mit Cy5-PTO-beladenen PEG-HSA-NP (▲) bzw. anti-HER2-HSA-NP (■) in Cy5-PTO-Konzentrationen von 100 nM, 250 nM, 500 nM und 1000 nM (n = 4).



Die für einen Antisense-Effekt notwendige ASO-Konzentration liegt bei 50 nM. Nach einer Inkubationsdauer von 6 h in Gegenwart von DOTAP werden bei dieser Konzentration 25% der SK-Br-3-Zellen mit Cy5-PTO transfiziert (Abbildung 3.32). Bei einer Konzentration von 100 nM werden 35% der Zellen erreicht. Die mit Cy5-PTO-beladenen PEG-HSA-NP ermöglichen selbst bei einer eingesetzten Konzentration von 1000 nM keine ausreichende Anreicherung des Cy5-PTO. Die PEG-HSA-NP-Konzentration von 1000 nM Cy5-PTO entspricht einer vergleichbaren Transfektion mit DOTAP von 10 nM Cy5-PTO. Dies ist für einen Antisense-Effekt bei weitem nicht ausreichend. Weitaus höhere Transfektionsraten lassen sich mit den Antikörper-modifizierten Nanopartikeln erzielen. Die anti-HER2-HSA-NP in den niedrigen Konzentrationen von 100 nM und 250 nM entsprechen Transfektionseffizienzen mittels DOTAP von 50 nM und 100 nM. Um einen Antisense-Effekt in der Zelle zu erhalten, bedeutet dies für einen Einsatz der Antikörper-modifizierten Nanopartikel, dass um das 2- bis 3-fach höhere Konzentrationen im Vergleich zum verwendeten DOTAP/ASO eingesetzt werden müssen.

Abbildung 3.33: Quantifizierung der Transfektionseffizienz: Cy5-PTO an oder in MCF7-Zellen, Inkubation über 6 h mit Cy5-PTO/DOTAP (●) in einem Cy5-PTO-Konzentrationsbereich von 0 bis 100 nM, mit Cy5-PTO-beladenen PEG-HSA-NP (▲) bzw. anti-HER2-HSA-NP (■) in Cy5-PTO-Konzentrationen von 100 nM, 250 nM, 500 nM und 1000 nM (n = 4).



In Abbildung 3.33 ist die Quantifizierung der Transfektionseffizienz für MCF7-Zellen dargestellt. Da die MCF7-Zellen nur geringe Mengen des HER2-Proteins auf der Zelloberfläche exprimieren, ist eine wesentlich geringere Anreicherung des Cy5-PTO in der Zelle zu erwarten. Die anti-HER2-HSA-NP in den hohen Konzentrationen von 500 nM und 1000 nM entsprechen Transfektionseffizienzen mittels DOTAP von 10 nM und 50 nM. Um einen Antisense-Effekt in der Zelle zu erhalten, bedeutet dies für einen Einsatz der Antikörper-modifizierten Nanopartikel, dass um das 20- bis 50-fach höhere Konzentrationen im Vergleich zum verwendeten DOTAP/ASO eingesetzt werden müssen. PEG-HSA-NP zeigen keine Assoziation mit den MCF7-Zellen, so dass selbst bei der höchsten Partikelkonzentration kein Cy5-PTO an oder in die Zelle gebracht werden kann.



### **3.8 Ausblick: Immunospezifische Nanopartikel als Trägersysteme für ASO**

Die Anwendung Antikörper-modifizierter Nanopartikel kann Arzneistoff-Trägereigenschaften mit einer zielgerichteten Tumorthherapie kombinieren. Diese Kombination von anti-HER2-modifizierten Nanopartikeln mit in die Nanopartikel inkorporierten Antisense-Oligonukleotiden stellt einen sehr vielversprechenden Ansatz in der Brustkrebstherapie dar. Anti-HER2-NP reicherten sich spezifisch und in hohem Ausmaß in HER2-überexprimierenden Zellen an, wodurch wurde eine sehr hohe ASO-Konzentration in diesen Zellen erzielt werden konnte. Da jedoch die HER2-überexprimierenden Zellen, die für eine Antisense-Testung zur Verfügung standen, sich nicht für den Nachweis eines Antisense-Effektes eigneten, konnte die entwickelte Kombination von ASO-beladenen anti-HER2-modifizierten Albumin-Nanopartikeln nicht weiter getestet werden.

Diese neue Generation von immunospezifischen Nanopartikeln sollte auf jeden Fall noch weiter im Einzelnen untersucht werden, um die Wirksamkeit als Arzneistoffträgersystem unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen zu belegen. Damit eröffnen sich neue Perspektiven in der Brustkrebstherapie.



## 4 Zusammenfassung

Die meisten nanopartikulären Ansätze im Bereich der Arzneiformenentwicklung befinden sich am Anfang der klinischen Evaluation, sodass das wirkliche Potenzial nanotechnologischer Produkte sich erst in den kommenden Jahren abzeichnen wird. Die Zusammenführung von „Drug-Targeting“ und „sustained release“ mit nanotechnologischer Entwicklung könnte in Zukunft zu einem Fortschritt in der Medizin beitragen.

Auf dem Gebiet der Antisense-Oligonukleotid (ASO)-Therapie stellt der ASO-Transfer in Zielzellen eine entscheidende Hürde dar. ASO benötigt, um im Körper an den Wirkort zu gelangen, einen zuverlässigen Träger, der vor dem Abbau in physiologischen Milieu schützt, den Transport über extra- und intrazelluläre Barrieren im Körper gewährleistet und die ASO zielgerichtet an den Wirkort bringt. Der Einbau von ASO in kolloidale Trägersysteme wie Nanopartikel vermittelt eine effiziente Aufnahme in Zellen bei gleichzeitigem Schutz vor abbauenden Enzymen im Körper. Des Weiteren kann eine gezielte Aufnahme in Zielzellen erreicht werden, die normalerweise nicht auftritt.

Bisherige Trägersysteme bestanden meist aus Nanopartikeln von synthetischen Materialien, die entweder die ASO an der Oberfläche adsorbiert oder in der Partikelmatrix inkorporiert hatten. Als Trägermaterialien wurden oft Polyalkylcyanoacrylate verwendet. Sie sind aufgrund ihrer negativen Ladung und Hydrophobizität nicht geeignet ohne Zugabe von Hilfsstoffen, welche in höheren Konzentrationen toxisch wirken, anionische hydrophile Substanzen wie ASO zu adsorbieren. Außerdem besteht bei Nanopartikeln mit adsorbierten ASO die Gefahr, dass es bei einer intravenösen Gabe zu einer Desorption der ASO kommt und somit ASO die Zielzellen nicht in verpackter Form erreicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden NP auf Basis von humanem Serumalbumin (HSA) als Trägersystem für ASO entwickelt. Durch Oberflächenmodifikation dieser Trägersysteme wurde eine Kopplung von anti-HER2 Antikörper ermöglicht und ein AK-vermitteltes Drug-Targeting erreicht. HSA als natürliches Makromolekül zeichnet sich durch geringe Toxizität und gute Biodegradierbarkeit aus. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass ein Wirkstoff mit vorhandenen Bindungsstellen im HSA-Molekül Wechselwirkungen eingehen kann, was eine erfolgreiche Einbindung gewährleistet. Zusätzlich eignen sich aus HSA hergestellte NP aufgrund funktioneller Gruppen an

der Partikeloberfläche für die Kopplung von Antikörpern und ermöglichen somit eine zielgerichtete Arzneistofftherapie. Die entwickelten Trägersysteme wurden hinsichtlich kolloidaler Parameter wie Teilchengröße, Oberflächenladung, ASO-Beladungseffizienz, Stabilität in physiologischen Medium und ihrem Vermögen, einen ASO-Effekt zu erzielen, in Zellkultur evaluiert.

### **4.1 Optimierung der Beladung von NP mit ASO**

Zunächst wurden HSA-NP hergestellt, bei denen die Beladung durch Inkorporieren des ASO in die Partikelmatrix erfolgte. Die Evaluierung des Desolvationsprozesses ergab eine Abhängigkeit der ASO-Beladung vom zugesetzten Desolvationsmittel Ethanol. Eine Mindestmenge eines 1,8-fachen Überschusses an Ethanol ist für die vollständige Desolvation des HSA und damit für die Einbindung des daran adsorbierten ASO erforderlich. Ebenso beeinflusste die Quervernetzung der Partikel die ASO-Beladungseffizienz. Je mehr Glutaraldehyd zugesetzt wurde, desto stabiler waren die NP. Nimmt die Menge des Glutaraldehyds von 40% auf 200% zu, löste sich um so weniger ASO während der Waschstschritte aus der Partikelmatrix heraus. Jedoch hat das Ausmaß der Quervernetzung einen entscheidenden Einfluss auf die Biodegradierbarkeit des Partikelsystems. Zu stark quervernetzte NP (Quervernetzung von 200%) können von intrazellulären Enzymen nicht mehr abgebaut werden, infolge dessen gelangt das eingebundene ASO nicht zu seinem Wirkort ins Zytoplasma.

Im Folgenden wurde versucht über die Einführung einer permanenten kationischen Ladung (EDC/Cholamin-Reaktion) im HSA-Molekül ein Trägerpolymer mit höherer Beladungskapazität im Vergleich zu nativem HSA zu etablieren. Ein geringer Anteil von kationisiertem HSA (cHSA) in der HSA-Partikelmatrix reichte aus, um die ASO-Beladungseffizienz um ein 2,5-faches signifikant zu steigern.

Das Ziel der Oberflächenmodifikation der HSA-NP war eine Positivierung des Zetapotentials, um die Bindung negativ geladener Wirkstoffe wie ASO über elektrostatische Wechselwirkungen zu ermöglichen. Die Umsetzung der HSA-NP mit EDC und Cholamin führte zu einer deutlichen Verschiebung des Zetapotentials von ca. -20,0 mV in den positiven Bereich (+38,6 mV). Durch die Inkubation mit ASO konnten so große Menge an ASO effizient an die Partikeloberfläche (NP+) gebunden werden.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse zeigte, dass die Beladung mit ASO in der Reihenfolge von Albumin-NP (HSA-NP) mit einer Beladungseffizienz von 7,6  $\mu\text{g ASO} / \text{mg NP}$  zu Nanopartikeln, die in der Partikelmatrix inkorporierten Anteil an kationisiertem Albumin enthielten (cHSA-NP) mit 18,2  $\mu\text{g ASO} / \text{mg NP}$ , zu Oberflächen-kationisierten Nanopartikeln (NP+) mit 100  $\mu\text{g ASO} / \text{mg NP}$  signifikant zunahm.

## **4.2 Mit ASO-beladene NP in der Zellkultur**

HSA-NP wurden von allen verwendeten Brustkrebszell-Linien gut vertragen. Nach Zellaufnahme der HSA-NP wurden bei niedriger Quervernetzung (40%) die Partikel gut intrazellulär abgebaut und das ASO in das Zytoplasma freigesetzt. Es konnte im CLSM gezeigt werden, dass die ASO-Freisetzung innerhalb von 24 h zunahm. Alle Versuche mittels den entwickelten ASO-beladenen Trägersystemen einen Antisense Effekt nachzuweisen schlugen fehl. Da die Beladung der HSA-NP nicht weiter erhöht werden konnte, richtete sich ein neuer Ansatz auf eine verbesserte Aufnahme der NP über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus.

## **4.3 Antikörper-vermittelte Anreicherung von NP in Zielzellen**

Die Anwendung von monoklonalen Antikörpern mit einer Spezifität gegenüber Tumorzellen ist eine relativ neue und spannende Modalität in der Krebstherapie. Eine der vielversprechenden Zielstrukturen für eine solche Immunotherapie stellt der HER2-Membranrezeptor dar, dessen Überexpression mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. HER2 ist ein Produkt des Proto-Onkogens erbB2, das für einen 185 kDa Transmembrantypotyrosinkinase Wachstumsfaktorrezeptor kodiert. Dieser Rezeptor ist in normalem Gewebe bei Erwachsenen nur geringfügig exprimiert [Press et al., 1990], aber ist bei ungefähr 30% der Patienten mit humanem Magenkarzinom, Lungen- und Brustkrebs überexprimiert. Gegenwärtig dient HER2 als Tumormarker für die zielgerichtete Behandlung mit dem humanisierten anti-HER2 AK Trastuzumab (Herceptin®) von Patientinnen bei metastasierendem Brustkrebs. Jedoch können bessere Ergebnisse erreicht werden, wenn Trastuzumab in Kombination mit anderen Zytostatika verabreicht wird.

Antikörper haben bei alleiniger Gabe eine ausreichende Antitumoraktivität, aber sie können auch konjugiert mit Zytostatika sowie Toxinen und Radionukliden, genutzt

werden, um diese zu den Tumoren bringen. Im Prinzip kann die Trägereigenschaft von Antikörpern gesteigert werden, wenn ein Antikörper an ein Arzneistoffreservoir, wie Nanopartikel oder Liposomen geknüpft ist. Der Vorteil dieses innovativen Ansatzes für eine zellspezifische Anreicherung im Vergleich zu herkömmlichen Biokonjugaten ist, dass eine höhere Arzneistoffträgerkapazität mit einer verbesserten Spezifität für eine zielgerichtete Pharmakotherapie kombiniert werden kann.

Wegen seiner erhöhten Expression in Tumorzellen, seiner extrazellulären Verfügbarkeit und seiner Fähigkeit nach Antikörperbindung internalisiert zu werden, stellt HER2 eine geeignete Zielstruktur für die Tumorthherapie mit zellspezifischen Nanopartikeln dar. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion Antikörper-modifizierter Protein-basierter Nanopartikel zu untersuchen und eine spezifische Aufnahme in HER2-überexprimierende Zell-Linien zu verbessern. Ein spezifisches Targeting wurde in verschiedenen Krebszell-Linien mit unterschiedlichen HER2-Expressionsleveln durch FACS-Analyse bewiesen. Die Versuche beinhalteten Inhibitionsexperimente durch Vorinkubation mit Trastuzumab, um die Selektivität der Bindungsstellen auf der Zelloberfläche zu unterstreichen. Die zelluläre Aufnahme dieser Nanopartikel, ebenso wie die zelluläre Verteilung, konnte im CLSM beobachtet werden. Diese ermutigenden Ergebnisse heben den potenziellen Wert Antikörper-modifizierter Nanopartikel für eine spezifische Anreicherung in Tumorzellen hervor. Anti-HER2-NP binden effizient an HER2-überexprimierende Zellen (85%) und werden anschließend internalisiert. Im Anschluss wurde die Beladung von ASO in HSA-NP mit den erhaltenen Erkenntnissen Antikörper-modifizierter HSA-NP kombiniert. Zunächst wurde die Freisetzung von farbmarkierten ASO aus AK-modifizierten HSA-NP in SK-Br-3- und MCF7-Zellen untersucht. Durch die spezifische Aufnahme der AK-modifizierten HSA-NP gelangt bereits innerhalb der ersten Stunde deutlich mehr ASO in die Zelle. Die Zellaufnahme und Freisetzung in das Zytosol der Zelle ist abhängig vom HER2-Protein auf der Zelloberfläche und nimmt über 24 h stark zu. SK-Br-3-Zellen reichern das farbmarkierte ASO stärker als die MCF7-Zellen an. Wirksame ASO-Konzentrationen können in SK-Br-3-Zellen mit einer sehr geringen Partikelkonzentration von nur 50 µg anti-HER2-NP/ml erzielt werden, während in MCF7-Zellen eine weit aus höhere Partikelkonzentration notwendig ist. Da die HER2-überexprimierenden Zellen, die für einen Antisense-Testung zur Verfügung standen, sich nicht für den Nachweis eines Antisense-Effektes eigneten, konnte die

entwickelte Kombination von ASO-beladenen AK-modifizierten Albumin-Nanopartikeln nicht weiter getestet werden.

In Kombination mit einem in die Nanopartikel inkorporierten Arzneistoff wird eine wirksame intrazelluläre Arzneistoffabgabe erwartet. Die Anwendung Antikörper-modifizierter Nanopartikel kann Arzneistoff-Trägereigenschaften mit einer zielgerichteten Tumorthherapie kombinieren. Diese neue Generation von immunspezifischen Nanopartikeln sollte auf jeden Fall noch weiter im Einzelnen untersucht werden, um die Wirksamkeit dieser Arzneistoffträgersysteme unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen zu belegen.





## 5 Literatur

- Ahmad, I., Longenecker, M., Samuel, J., and Allen, T. M.:** Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice. *Cancer Res* 53 (7): 1484-1488, 1993.
- Akasaka, Y., Ueda, H., Takayama, K., Machida, Y., and Nagai, T.:** Preparation and evaluation of bovine serum albumin nanospheres coated with monoclonal antibodies. *Drug Design Deliv* 3: 85-97, 1988.
- Arnedo, A., Espuelas, S., and Irache, J.:** Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *Int J Pharm* 244 (1-2): 59-72, 2002.
- Arnedo, A., Irache, J. M., Gonzalez Gaitano, G., Valganon, M., and Espuelas, S.:** Bovine serum albumin modified the intracellular distribution and improved the antiviral activity of an oligonucleotide. *J Drug Target* 11 (4): 197-204, 2003.
- Arnedo, A., Irache, J. M., Merodio, M., and Espuelas Millan, M. S.:** Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. *J Control Release* 94 (1): 217-227, 2004.
- Astier, A., Doat, B., Ferrer, M. J., Benoit, G., Fleury, J., Rolland, A., and Leverage, R.:** Enhancement of adriamycin antitumor activity by its binding with an intracellular sustained-release form, polymethacrylate nanospheres, in U-937 cells. *Cancer Res* 48 (7): 1835-1841, 1988.
- Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A. G., and Ithakissios, D. S.:** PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J Control Release* 79 (1-3): 123-135, 2002.
- Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., and Mendelsohn, J.:** Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 58 (13): 2825-2831, 1998.
- Bazile, D., Prud'homme, C., Bassoullet, M. T., Marlard, M., Spenlehauer, G., and Veillard, M.:** Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm Sci* 84 (4): 493-498, 1995.
- Bazile, D. V., Ropert, C., Huve, P., Verrecchia, T., Marlard, M., Frydman, A., Veillard, M., and Spenlehauer, G.:** Body distribution of fully biodegradable [<sup>14</sup>C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials* 13 (15): 1093-1102, 1992.
- Beck, P., Kreuter, J., Reszka, R., and Fichtner, I.:** Influence of polybutylcyanoacrylate nanoparticles and liposomes on the efficacy and toxicity of the anticancer drug mitoxantrone in murine tumour models. *J Microencapsul* 10 (1): 101-114, 1993.
- Bellocq, N. C., Pun, S. H., Jensen, G. S., and Davis, M. E.:** Transferrin-containing, cyclodextrin polymer-based particles for tumor-targeted gene delivery. *Bioconjug Chem* 14 (6): 1122-1132, 2003.
- Berton, M., Benimetskaya, L., Allemann, E., Stein, C. A., and Gurny, R.:** Uptake of oligonucleotide-loaded nanoparticles in prostatic cancer cells and their intracellular localization. *Eur J Pharm Biopharm* 47 (2): 119-123, 1999.

- Berton, M., Turelli, P., Trono, D., Stein, C. A., Allemann, E., and Gurny, R.:** Inhibition of HIV-1 in cell culture by oligonucleotide-loaded nanoparticles. *Pharm Res* 18 (8): 1096-1101, 2001.
- Bijsterbosch, M. K., Manoharan, M., Dorland, R., Waarlo, I. H., Biessen, E. A., and van Berkel, T. J.:** Delivery of cholesteryl-conjugated phosphorothioate oligodeoxynucleotides to Kupffer cells by lactosylated low-density lipoprotein. *Biochem Pharmacol* 62 (5): 627-633, 2001.
- Bourdon, O., Mosqueira, V., Legrand, P., and Blais, J.:** A comparative study of the cellular uptake, localization and phototoxicity of meta-tetra(hydroxyphenyl) chlorin encapsulated in surface-modified submicronic oil/water carriers in HT29 tumor cells. *J Photochem Photobiol B* 55 (2-3): 164-171, 2000.
- Boutorine, A. S., and Kostina, E. V.:** Reversible covalent attachment of cholesterol to oligodeoxyribonucleotides for studies of the mechanisms of their penetration into eucaryotic cells. *Biochimie* 75 (1-2): 35-41, 1993.
- Brannon-Peppas, L., and Blanchette, J. O.:** Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 56 (11): 1649-59, 2004.
- Brasseur, F., Couvreur, P., Kante, B., Deckers-Passau, L., Roland, M., Deckers, C., and Speiser, P.:** Actinomycin D absorbed on polymethylcyanoacrylate nanoparticles: increased efficiency against an experimental tumor. *Eur J Cancer* 16 (11): 1441-1445, 1980.
- Breton, P., Guillon, X., Roy, D., Lescure, F., Riess, G., Bru, N., and Roques-Carnes, C.:** Physico-chemical characterization, preparation and performance of poly (methylidene malonate 2.1.2) nanoparticles. *Biomaterials* 19 (1-3): 271-281, 1998.
- Brooks, S. C., Locke, E. R., and Soule, H. D.:** Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 248 (17): 6251-6253, 1973.
- Cailleau, R., Olive, M., and Cruciger, Q. V.:** Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14 (11): 911-915, 1978.
- Carreno-Gomez, B., Woodley, J. F., and Florence, A. T.:** Studies on the uptake of tomato lectin nanoparticles in everted gut sacs. *Int J Pharm* 183 (1): 7-11, 1999.
- Chavany, C., Le Doan, T., Couvreur, P., Puisieux, F., and Helene, C.:** Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides. *Pharm Res* 9 (4): 441-449, 1992.
- Chavany, C., Saison-Behmoaras, T., Le Doan, T., Puisieux, F., Couvreur, P., and Helene, C.:** Adsorption of oligonucleotides onto polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake. *Pharm Res* 11 (9): 1370-1378, 1994.
- Chawla, J. S., and Amiji, M. M.:** Cellular uptake and concentrations of tamoxifen upon administration in poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles. *AAPS PharmSci* 5 (1): E3, 2003.
- Chiannilkulchai, N., Ammouy, N., Caillou, B., Devissaguet, J. P., and Couvreur, P.:** Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M 5076 metastasis-bearing mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 26 (2): 122-126, 1990.
- Chiannilkulchai, N., Driouch, Z., Benoit, J. P., Parodi, A. L., and Couvreur, P.:** Doxorubicin-loaded nanoparticles: increased efficiency in murine hepatic metastases. *Sel Cancer Ther* 5 (1): 1-11, 1989.

- Cho, C. S., Cho, K. Y., Park, I. K., Kim, S. H., Sasagawa, T., Uchiyama, M., and Akaike, T.:** Receptor-mediated delivery of all trans-retinoic acid to hepatocyte using poly(L-lactic acid) nanoparticles coated with galactose-carrying polystyrene. *J Control Release* 77 (1-2): 7-15, 2001a.
- Cho, C. S., Kobayashi, A., Takei, R., Ishihara, T., Maruyama, A., and Akaike, T.:** Receptor-mediated cell modulator delivery to hepatocyte using nanoparticles coated with carbohydrate-carrying polymers. *Biomaterials* 22 (1): 45-51, 2001b.
- Coester, C. J., Langer, K., von Briesen, H., and Kreuter, J.:** Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J. Microencapsul.* 17 (2): 187-193, 2000.
- Cui, Z., and Mumper, R. J.:** Coating of cationized protein on engineered nanoparticles results in enhanced immune responses. *Int J Pharm* 238 (1-2): 229-39, 2002.
- Damascelli, B., Cantu, G., Mattavelli, F., Tamplenizza, P., Bidoli, P., Leo, E., Dosio, F., Cerrotta, A. M., Di Tolla, G., Frigerio, L. F., Garbagnati, F., Lanocita, R., Marchiano, A., Patelli, G., Spreafico, C., Ticha, V., Vespro, V., and Zunino, F.:** Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): Phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity. *Cancer* 92 (10): 2592-2602, 2001.
- Davda, J., and Labhasetwar, V.:** Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int J Pharm* 233 (1-2): 51-59, 2002.
- de Verdiere, A. C., Dubernet, C., Nemati, F., Soma, E., Appel, M., Ferte, J., Bernard, S., Puisieux, F., and Couvreur, P.:** Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action. *Br J Cancer* 76 (2): 198-205, 1997.
- Delie, F., Berton, M., Allemann, E., and Gurny, R.:** Comparison of two methods of encapsulation of an oligonucleotide into poly(D,L-lactic acid) particles. *Int J Pharm* 214 (1-2): 25-30, 2001.
- Desai, M. P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R. J., and Amidon, G. L.:** The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 14 (11): 1568-1573, 1997.
- Dunn, S. E., Brindley, A., Davis, S. S., Davies, M. C., and Illum, L.:** Polystyrene-poly (ethylene glycol) (PS-PEG2000) particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on the in vitro cell interaction and in vivo biodistribution. *Pharm Res* 11 (7): 1016-1022, 1994.
- Eigler, A., Sinha, B., Hartmann, G., and Endres, S.:** Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* 18 (10): 487-492, 1997.
- Elaissari, A., Cros, P., Pichot, C., Laurent, V., and Mandrand, B.:** Adsorption of oligonucleotides onto negatively and positively charged latex particles. *Coll and Surf* 83: 25-31, 1994.
- Emile, C., Bazile, D., Herman, F., Helene, C., and Veillard, M.:** Encapsulation of oligonucleotide in Stealth Me.PEG-PLA50 nanoparticles by complexation with structured oligopeptides. *Drug Deliv* 3: 187-195, 1996.

- Ezpeleta, I., Arangoa, M. A., Irache, J. M., Stainmesse, S., Chabenat, C., Popineau, Y., and Orecchioni, A. M.:** Preparation of *Ulex europaeus* lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus. *Int J Pharm* 191 (1): 25-32, 1999.
- Fattal, E., Vauthier, C., Aynie, I., Nakada, Y., Lambert, G., Malvy, C., and Couvreur, P.:** Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *J Control Release* 53 (1-3): 137-143, 1998.
- Filion, M. C., and Phillips, N. C.:** Anti-inflammatory activity of cationic lipids. *Br J Pharmacol* 122 (3): 551-557, 1997.
- Fritz, H., Maier, M., and Bayer, E.:** Cationic polystyrene nanoparticles: preparation and characterization of a model drug carrier system for antisense oligonucleotides. *J Colloid Interface Sci* 195 (2): 272-288, 1997.
- Furumoto, K., Ogawara, K., Nagayama, S., Takakura, Y., Hashida, M., Higaki, K., and Kimura, T.:** Important role of serum proteins associated on the surface of particles in their hepatic disposition. *J Control Release* 83 (1): 89-96, 2002.
- Ganachaud, F., Elaissari, A., and Pichot, C.:** Covalent grafting of polythymidylic acid onto amine-containing polystyrene latex particles. *J Biomater Sci Polym Ed* 11 (9): 931-945, 2000.
- Gaur, U., Sahoo, S. K., De, T. K., Ghosh, P. C., Maitra, A., and Ghosh, P. K.:** Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int J Pharm* 202 (1-2): 1-10, 2000.
- Gelperina, S. E., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Smirnova, Z. S., Bobruskin, A. I., Severin, S. E., Turowski, B., Zanella, F. E., and Kreuter, J.:** Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma. *Toxicol Lett* 126 (2): 131-141, 2002.
- Geselowitz, D. A., and Neckers, L. M.:** Bovine serum albumin is a major oligonucleotide-binding protein found on the surface of cultured cells. *Antisense Res Dev* 5: 213-217, 1995.
- Ghosh, C., and Iversen, P. L.:** Intracellular delivery strategies for antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10 (4): 263-274, 2000.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., and Parks, W. P.:** In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51 (5): 1417-1423, 1973.
- Godard, G., Botorine, A. S., Saison-Behmoaras, E., and Helene, C.:** Antisense effects of cholesterol-oligodeoxynucleotide conjugates associated with poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Biochem* 232 (2): 404-410, 1995.
- Gonzalez Ferreiro, M., Tillman, L., Hardee, G., and Bodmeier, R.:** Characterization of complexes of an antisense oligonucleotide with protamine and poly-L-lysine salts. *J Control Release* 73 (2-3): 381-390, 2001.
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., and Langer, R.:** Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263 (5153): 1600-1603, 1994.
- Gullick, W. J., and Srinivasan, R.:** The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 52 (1-3): 43-53, 1998.

- Gupta, P. K., Hung, C. T., and Perrier, D. G.:** Albumin microspheres. I. Release characteristics of adriamycin. *Int. J. Pharm.* 33: 137-146, 1986.
- Harari, D., and Yarden, Y.:** Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19 (53): 6102-6114, 2000.
- Hirabayashi, H., Nishikawa, M., Takakura, Y., and Hashida, M.:** Development and pharmacokinetics of galactosylated poly-L-glutamic acid as a biodegradable carrier for liver-specific drug delivery. *Pharm Res* 13 (6): 880-884, 1996.
- Högemann, D., Josephson, L., Weissleder, R., and Basilion, J. P.:** Improvement of MRI probes to allow efficient detection of gene expression. *Bioconjug Chem* 11 (6): 941-946, 2000.
- Holtrich, U., Wolf, G., Brauning, A., Karn, T., Bohme, B., Rubsamen-Waigmann, H., and Strebhardt, K.:** Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (5): 1736-40, 1994.
- Hood, J. D., Bednarski, M., Frausto, R., Guccione, S., Reisfeld, R. A., Xiang, R., and Cheres, D. A.:** Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 296 (5577): 2404-2407, 2002.
- Hunter, T.:** Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100 (1): 113-127, 2000.
- Hussain, N., Jani, P. U., and Florence, A. T.:** Enhanced oral uptake of tomato lectin-conjugated nanoparticles in the rat. *Pharm Res* 14 (5): 613-618, 1997.
- Hynes, N. E., and Stern, D. F.:** The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198 (2-3): 165-184, 1994.
- Illum, L., Jones, P., Kreuter, J., Baldwin, R., and Davis, S. S.:** Adsorption of monoclonal antibodies to polyhexalcyanoacrylate nanoparticles and subsequent immunospecific binding to tumour cells in vitro. *Int J Pharm* 17 (17): 65-76, 1983.
- Irache, J. M., Durrer, C., Duchene, D., and Ponchel, G.:** Preparation and characterization of lectin-latex conjugates for specific bioadhesion. *Biomaterials* 15 (11): 899-904, 1994.
- Jansen, B., and Zangemeister-Wittke, U.:** Antisense therapy for cancer--the time of truth. *Lancet Oncol* 3 (11): 672-683, 2002.
- Jones, C., Burton, M. A., and Gray, B. N.:** Albumin microspheres as vehicles for the sustained and controlled release of doxorubicin. *J Pharm Pharmacol* 41 (12): 813-816, 1989.
- Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Fähling, H., and Felix, R.:** Magnetic fluid hyperthermia: Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater* 210: 413-419, 1999a.
- Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Schirra, H., Schiestel, T., Schmidt, H., and Felix, R.:** Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro. *J Magn Magn Mater* 194: 185-196, 1999b.
- Junghans, M., Kreuter, J., and Zimmer, A.:** Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles. *Nucleic Acids Res* 28 (10): E45, 2000.
- Junghans, M., Kreuter, J., and Zimmer, A.:** Phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotide condensation and preparation of antisense nanoparticles. *Biochim Biophys Acta* 1544 (1-2): 177-188, 2001.

- Kaul, G., and Amiji, M.:** Long-circulating poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery. *Pharm Res* 19 (7): 1061-1067, 2002.
- King, C. R., Kraus, M. H., and Aaronson, S. A.:** Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229 (4717): 974-976, 1985.
- Kirpotin, D., Park, J. W., Hong, K., Zalipsky, S., Li, W. L., Carter, P., Benz, C. C., and Papahadjopoulos, D.:** Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry* 36 (1): 66-75, 1997.
- Klapper, L. N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N. E., Andrews, G. C., Sela, M., and Yarden, Y.:** The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (9): 4995-5000, 1999.
- Klapper, L. N., Kirschbaum, M. H., Sela, M., and Yarden, Y.:** Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 77: 25-79, 2000.
- Kreuter, J.:** Nanoparticles and nanocapsules--new dosage forms in the nanometer size range. *Pharm Acta Helv* 53 (2): 33-39, 1978.
- Kreuter, J.:** Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 47 (1): 65-81, 2001.
- Kreuter, J., Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S. E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., von Briesen, H., and Begley, D. J.:** Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm Res* 20 (3): 409-416, 2003.
- Lambert, G., Fattal, E., Brehier, A., Feger, J., and Couvreur, P.:** Effect of polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles and lipofectin loaded with oligonucleotides on cell viability and PKC alpha neosynthesis in HepG2 cells. *Biochimie* 80 (12): 969-976, 1998.
- Langer, K., Coester, C., Weber, C., von Briesen, H., and Kreuter, J.:** Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *Eur J Pharm Biopharm* 49: 303-307, 2000.
- Lasfargues, E. Y., Coutinho, W. G., and Redfield, E. S.:** Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 61 (4): 967-978, 1978.
- Lenaerts, V., Nagelkerke, J. F., Van Berkel, T. J., Couvreur, P., Grislain, L., Roland, M., and Speiser, P.:** In vivo uptake of polyisobutyl cyanoacrylate nanoparticles by rat liver Kupffer, endothelial, and parenchymal cells. *J Pharm Sci* 73 (7): 980-982, 1984.
- Lewis, G. D., Figari, I., Fendly, B., Wong, W. L., Carter, P., Gorman, C., and Shepard, H. M.:** Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 37 (4): 255-263, 1993.
- Li, L., Wartchow, C. A., Danthi, S. N., Shen, Z., Dechene, N., Pease, J., Choi, H. S., Doede, T., Chu, P., Ning, S., Lee, D. Y., Bednarski, M. D., and Knox, S. J.:** A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 (4): 1215-1227, 2004.
- Lin, W., Coombes, A. G., Garnett, M. C., Davies, M. C., Schacht, E., Davis, S. S., and Illum, L.:** Preparation of sterically stabilized human serum albumin nanospheres using a novel Dextranox-MPEG crosslinking agent. *Pharm Res* 11 (11): 1588-1592, 1994.



- Lin, W., Garnett, M. C., Davis, S. S., Schacht, E., Ferruti, P., and Illum, L.:** Preparation and characterisation of rose Bengal-loaded surface-modified albumin nanoparticles. *J Control Release* 71 (1): 117-126, 2001.
- Lin, W., Garnett, M. C., Schacht, E., Davis, S. S., and Illum, L.:** Preparation and in vitro characterization of HSA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm* 189 (2): 161-170, 1999.
- Lockman, P. R., Mumper, R. J., Khan, M. A., and Allen, D. D.:** Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm* 28 (1): 1-13, 2002.
- Lode, J., Fichtner, I., Kreuter, J., Berndt, A., Diederichs, J. E., and Reszka, R.:** Influence of surface-modifying surfactants on the pharmacokinetic behavior of <sup>14</sup>C-poly (methylmethacrylate) nanoparticles in experimental tumor models. *Pharm Res* 18 (11): 1613-9, 2001.
- Maeda, H.:** The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul* 41: 189-207, 2001.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K.:** Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65 (1-2): 271-284, 2000.
- Marty, J. J., Oppenheim, R. C., and Speiser, P.:** Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta Helv* 53 (1): 17-23, 1978.
- McClean, S., Prosser, E., Meehan, E., O'Malley, D., Clarke, N., Ramtoola, Z., and Brayden, D.:** Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. *Eur J Pharm Sci* 6 (2): 153-163, 1998.
- Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P. C., and Maitra, A. N.:** Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J Control Release* 74 (1-3): 317-323, 2001.
- Moghimi, S. M., and Davis, S. S.:** Innovations in avoiding particle clearance from blood by Kupffer cells: cause for reflection. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 11 (1): 31-59, 1994.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., and Murray, J. C.:** Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53 (2): 283-318, 2001.
- Moghimi, S. M., Muir, I. S., Illum, L., Davis, S. S., and Kolb-Bachofen, V.:** Coating particles with a block co-polymer (poloxamine-908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonins in the serum. *Biochim Biophys Acta* 1179 (2): 157-165, 1993.
- Mosmann, T.:** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2): 55-63, 1983.
- Mukherjee, S., Ghosh, R., and Maxfield, F.:** Endocytosis. *Physiol Rev* 77 (3): 759-803, 1997.
- Na, K., Park, K. H., Kim, S. W., and Bae, Y. H.:** Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2). *J Control Release* 69 (2): 225-236, 2000.
- Nakada, Y., Fattal, E., Foulquier, M., and Couvreur, P.:** Pharmacokinetics and biodistribution of oligonucleotide adsorbed onto poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration in mice. *Pharm Res* 13 (1): 38-43, 1996.
- Nielsen, U. B., and Marks, J. D.:** Internalizing antibodies and targeted cancer therapy: direct selection from phage display libraries. *Pharm Sci Technol Today* 3 (8): 282-291, 2000.

- Olivier, J. C., Huertas, R., Lee, H. J., Calon, F., and Pardridge, W. M.:** Synthesis of pegylated immunonanoparticles. *Pharm Res* 19 (8): 1137-1143, 2002.
- Onishi, H., and Machida, Y.:** Antitumor properties of irinotecan-containing nanoparticles prepared using poly(DL-lactic acid) and poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol). *Biol Pharm Bull* 26 (1): 116-119, 2003.
- Oyewumi, M. O., Yokel, R. A., Jay, M., Coakley, T., and Mumper, R. J.:** Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice. *J Control Release* 95 (3): 613-626, 2004.
- Panyam, J., and Labhasetwar, V.:** Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res* 20 (2): 212-220, 2003.
- Panyam, J., Zhou, W., Prabha, S., Sahoo, S., and Labhasetwar, V.:** Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *Faseb J* 16 (10): 1217-1226, 2002.
- Park, J. W., Kirpotin, D. B., Hong, K., Shalaby, R., Shao, Y., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Papahadjopoulos, D., and Benz, C. C.:** Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *J Control Release* 74 (1-3): 95-113, 2001.
- Patel, H. M.:** Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 9 (1): 39-90, 1992.
- Pegram, M. D., Finn, R. S., Arzoo, K., Beryt, M., Pietras, R. J., and Slamon, D. J.:** The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 15 (5): 537-547, 1997.
- Peracchia, M. T., Fattal, E., Desmaele, D., Besnard, M., Noel, J. P., Gomis, J. M., Appel, M., d'Angelo, J., and Couvreur, P.:** Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release* 60 (1): 121-128, 1999.
- Peracchia, M. T., Vauthier, C., Puisieux, F., and Couvreur, P.:** Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res* 34 (3): 317-326, 1997.
- Prabha, S., Zhou, W. Z., Panyam, J., and Labhasetwar, V.:** Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm* 244 (1-2): 105-115, 2002.
- Press, M. F., Cordon-Cardo, C., and Slamon, D. J.:** Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5 (7): 953-962, 1990.
- Qaddoumi, M., Gukasyan, H., Davda, J., Labhasetwar, V., Kim, K., and Lee, V.:** Clathrin and caveolin-1 expression in primary pigmented rabbit conjunctival epithelial cells: role in PLGA nanoparticle endocytosis. *Mol Vis* 9: 559-568, 2003.
- Raubert, N. R., Jany, K. D., and Pfeleiderer, G.:** Ribonuclease A digestion by proteinase K. *Z Naturforsch [C]* 33 (9-10): 660-663, 1986.
- Reszka, R., Beck, P., Fichtner, I., Hentschel, M., Richter, J., and Kreuter, J.:** Body distribution of free, liposomal and nanoparticle-associated mitoxantrone in B16-melanoma-bearing mice. *J Pharmacol Exp Ther* 280 (1): 232-237, 1997.

- Rhaese, S., von Briesen, H., Rübsamen-Waigmann, H., Kreuter, J., and Langer, K.:** Human serum albumin-polyethylenimine nanoparticles for gene delivery. *J Control Release* 92: 199-208, 2003.
- Rolland, A., Bourel, D., Genetet, B., and Le Verge, R.:** Monoclonal antibodies covalently coupled to polymethacrylic nanoparticles: in vitro specific targeting to human T lymphocytes. *Int J Pharm* 39 (39): 173-180, 1987.
- Ropero, S., Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Montero, S., Cortes-Funes, H., and Colomer, R.:** Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 86 (2): 125-137, 2004.
- Roser, M., Fischer, D., and Kissel, T.:** Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 46 (3): 255-263, 1998.
- Russell-Jones, G. J., Veitch, H., and Arthur, L.:** Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells. *Int J Pharm* 190 (2): 165-174, 1999.
- Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S., and Labhasetwar, V.:** Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Release* 82 (1): 105-114, 2002.
- Sato, Y., Kaneko, K., Mikami, K., Mizugaki, M., and Suzuki, Y.:** Isolation of bovine serum albumin fragment P-9 and P-9-mediated fusion of small unilamellar vesicles. *Biol Pharm Bull* 22 (12): 1360-1365, 1999.
- Schwab, G., Chavany, C., Duroux, I., Goubin, G., Lebeau, J., Helene, C., and Saison-Behmoaras, T.:** Antisense oligonucleotides adsorbed to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles specifically inhibit mutated Ha-ras-mediated cell proliferation and tumorigenicity in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (22): 10460-10464, 1994.
- Shak, S.:** Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol* 26 (4 Suppl 12): 71-77, 1999.
- Sharma, D., Chelvi, T. P., Kaur, J., Chakravorty, K., De, T. K., Maitra, A., and Ralhan, R.:** Novel Taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol for drug delivery in cancer therapy. *Oncol Res* 8 (7-8): 281-286, 1996.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L.:** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (4785): 177-182, 1987.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and et al.:** Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244 (4905): 707-712, 1989.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C.:** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1): 76-85, 1985.
- Soma, C. E., Dubernet, C., Bentolila, D., Benita, S., and Couvreur, P.:** Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 21 (1): 1-7, 2000.

- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., and Rudzinski, W. E.:** Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 70: 1-20, 2001.
- Spänkuch-Schmitt, B., Wolf, G., Solbach, C., Loibl, S., Knecht, R., Stegmüller, M., von Minckwitz, G., Kaufmann, M., and Streibhardt, K.:** Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells. *Oncogene* 21 (20): 3162-71, 2002.
- Srinivasan, S. K., Tewary, H. K., and Iversen, P. L.:** Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin. *Antisense Res. Dev.* 5 (2): 131-139, 1995.
- Steiniger, S. C., Kreuter, J., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Bobruskin, A. I., Smirnova, Z. S., Severin, S. E., Uhl, R., Kock, M., Geiger, K. D., and Gelperina, S. E.:** Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int J Cancer* 109 (5): 759-67, 2004.
- Stella, B., Arpicco, S., Peracchia, M. T., Desmaele, D., Hoebeke, J., Renoir, M., D'Angelo, J., Cattel, L., and Couvreur, P.:** Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *J Pharm Sci* 89 (11): 1452-64, 2000.
- Sugano, M., Egilmez, N. K., Yokota, S. J., Chen, F. A., Harding, J., Huang, S. K., and Bankert, R. B.:** Antibody targeting of doxorubicin-loaded liposomes suppresses the growth and metastatic spread of established human lung tumor xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 60 (24): 6942-6949, 2000.
- Suh, H., Jeong, B., Liu, F., and Kim, S. W.:** Cellular uptake study of biodegradable nanoparticles in vascular smooth muscle cells. *Pharm Res* 15 (9): 1495-8, 1998.
- Tiefenauer, L. X., Tschirky, A., Kuhne, G., and Andres, R. Y.:** In vivo evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI. *Magn Reson Imaging* 14 (4): 391-402, 1996.
- Tondelli, L., Ricca, A., Laus, M., Lelli, M., and Citro, G.:** Highly efficient cellular uptake of c-myc antisense oligonucleotides through specifically designed polymeric nanospheres. *Nucleic Acids Res* 26 (23): 5425-5431, 1998.
- Trempe, G. L.:** Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res* (57): 33-41, 1976.
- Tröster, S., Müller, U., and Kreuter, J.:** Modification of the body distribution of polymethylmethacrylate nanoparticles in rats by coating with surfactants. *Int J Pharm* 61 (61): 85-100, 1990.
- Tröster, S. D., and Kreuter, J.:** Influence of the surface properties of low contact angle surfactants on the body distribution of <sup>14</sup>C-poly(methyl methacrylate) nanoparticles. *J Microencapsul* 9 (1): 19-28, 1992.
- Truong-Le, V. L., Walsh, S. M., Schweibert, E., Mao, H. Q., Guggino, W. B., August, J. T., and Leong, K. W.:** Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres. *Arch Biochem Biophys* 361 (1): 47-56, 1999.
- Ullrich, A., and Schlessinger, J.:** Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61 (2): 203-212, 1990.

- Velge-Roussel, F., Breton, P., Guillon, X., Lescure, F., Bru, N., Bout, D., and Hoebeke, J.:** Immunochemical characterization of antibody-coated nanoparticles. *Experientia* 52 (8): 803-806, 1996.
- Venter, D. J., Tuzi, N. L., Kumar, S., and Gullick, W. J.:** Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 2 (8550): 69-72, 1987.
- Verdun, C., Brasseur, F., Vranckx, H., Couvreur, P., and Roland, M.:** Tissue distribution of doxorubicin associated with polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles. *Cancer Chemother Pharmacol* 26 (1): 13-18, 1990.
- Waelti, E., Wegmann, N., Schwaninger, R., Wetterwald, A., Wingenfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., and Gimmi, C. D.:** Targeting her-2/neu with antirat Neu virosomes for cancer therapy. *Cancer Res* 62 (2): 437-444, 2002.
- Wang, S. C., Zhang, L., Hortobagyi, G. N., and Hung, M. C.:** Targeting HER2: recent developments and future directions for breast cancer patients. *Semin Oncol* 28 (6 Suppl 18): 21-29, 2001.
- Wartlick, H., Michaelis, K., Balthasar, S., Strebhardt, K., Kreuter, J., and Langer, K.:** Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells. *J Drug Target* 12 (7): 461-471, 2004a.
- Wartlick, H., Spänkuch-Schmitt, B., Strebhardt, K., Kreuter, J., and Langer, K.:** Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles. *J Control Release* 96 (3): 483-495, 2004b.
- Webb, A., Cunningham, D., Cotter, F., Clarke, P. A., di Stefano, F., Ross, P., Corbo, M., and Dziwanowska, Z.:** BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 349 (9059): 1137-1141, 1997.
- Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., and Langer, K.:** Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm* 194 (1): 91-102, 2000a.
- Weber, C., Reiss, S., and Langer, K.:** Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. *Int J Pharm* 211: 67-78, 2000b.
- Wiewrodt, R., Thomas, A. P., Cipelletti, L., Christofidou-Solomidou, M., Weitz, D. A., Feinstein, S. I., Schaffer, D., Albelda, S. M., Koval, M., and Muzykantov, V. R.:** Size-dependent intracellular immunotargeting of therapeutic cargoes into endothelial cells. *Blood* 99 (3): 912-922, 2002.
- Wilting, J., Hart, B. J., and De Gier, J. J.:** The role of albumin conformation in the binding of diazepam to human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 626 (2): 291-298, 1980a.
- Wilting, J., van der Giesen, W. F., Janssen, L. H., Weideman, M. M., Otagiri, M., and Perrin, J. H.:** The effect of albumin conformation on the binding of warfarin to human serum albumin. The dependence of the binding of warfarin to human serum albumin on the hydrogen, calcium, and chloride ion concentrations as studied by circular dichroism, fluorescence, and equilibrium dialysis. *J Biol Chem* 255 (7): 3032-3037, 1980b.
- Yarden, Y., and Ullrich, A.:** Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57: 443-478, 1988.

- Yoo, H. S., Lee, K. H., Oh, J. E., and Park, T. G.:** In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J Control Release* 68 (3): 419-431, 2000.
- Yu, D., Wang, S. S., Dulski, K. M., Tsai, C. M., Nicolson, G. L., and Hung, M. C.:** c-erbB-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer Res* 54 (12): 3260-3266, 1994.
- Zamecnik, P. C., and Stephenson, M. L.:** Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (1): 280-284, 1978.
- Zhang, Y., Jeong Lee, H., Boado, R. J., and Pardridge, W. M.:** Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells. *J Gene Med* 4 (2): 183-194, 2002.
- Zobel, H., Stieneker, F., Atmaca-Abdel Aziz, S., Gilbert, M., Werner, D., Noe, C., Kreuter, J., and Zimmer, A.:** Evaluation of aminoalkylmethacrylate nanoparticles as colloidal drug carrier systems. Part II: characterization of antisense oligonucleotides loaded copolymer nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 48 (1): 1-12, 1999.
- Zobel, H. P., Kreuter, J., Werner, D., Noe, C. R., Kumel, G., and Zimmer, A.:** Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7 (5): 483-93, 1997.
- Zuany-Amorim, C., Hastewell, J., and Walker, C.:** Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. *Nat Rev Drug Discov* 1 (10): 797-807, 2002.

## 6 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Heidrun Wartlick  
Geboren am: 24.02.1974 in Tübingen

### Schulausbildung:

Aug 80 - Juli 84 Grundschule in Backnang  
Aug 84 - Juni 93 Max Born Gymnasium in Backnang

### Studium:

Okt 94 - April 99 Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt  
Famulatur Wellingtonien Apotheke, Wüstenrot  
Fresenius AG, Friedrichsdorf  
März 97 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
April 99 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Aug 00 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
und Erlangung der Approbation als Apothekerin

### Pharmaziepraktikum:

Mai 99 - Dez 99 Insel Apotheke, Frankfurt  
Jan 00 - Juni 00 Institute of Pharmacognosy, Kings College London, UK

### Japanaufenthalte:

Aug 93 – Juli 94 Freiwilliges soziales Jahr, Dohoku-Center, Nayoro, Hokkaido  
Sept 97 Praktikum: Hokkaido-Uniklinikapotheke, Sapporo  
Juli 04 – Aug 04 Forschungsstipendium:  
Department of Pharmaceutical Engineering,  
Gifu Pharmaceutical University, Gifu



**Promotion:**

- |            |  |
|------------|--|
| ab Okt 00  | Anfertigung der Dissertation am Institut für Pharmazeutische Technologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt |
| ab März 01 | Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am oben-<br>genannten Institut  |

**Wissenschaftliche Veröffentlichungen:**

- Wartlick H, Spänkuch-Schmitt B, Strebhardt K, Kreuter J, Langer K:  
Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles; J Control Release. 2004 May 18;96(3): 483-95
- Wartlick H, Michaelis K, Balthasar S, Strebhardt K, Kreuter J, Langer K:  
Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells; J Drug Target. 2004; 12(7): 461-71